

## Promotor zur epidermisspezifischen Transgenexpression in Pflanzen

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft Promotorregionen, unter deren Kontrolle  
Transgene in Pflanzen epidermisspezifisch exprimiert werden können. Weiterhin  
betrifft die Erfindung rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die diese  
Promotorregionen umfassen und transgene Pflanzen und Pflanzenzellen, die mit  
diesen Nukleinsäuremolekülen transformiert wurden, sowie Verfahren zu deren  
10 Herstellung. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung Nukleinsäuremoleküle  
umfassend einen erfindungsgemäßen Promotor und Nukleinsäuresequenzen bzw.  
Transgene, die Pathogenresistenz vermitteln können sowie mit diesen Nukleinsäure-  
molekülen transformierte Pflanzen und Pflanzenzellen und Verfahren zu deren  
Herstellung.

15

- Als Promotoren werden allgemein diejenigen DNA-Bereiche eines Gens bezeichnet,  
die stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes liegen und durch die der  
Initiationspunkt und die Initiationshäufigkeit der Transkription und somit die  
Expressionsstärke und das Expressionsmuster des kontrollierten Gens festgelegt  
20 werden. An die Promotoren binden die RNA-Polymerase und spezifische, die RNA-  
Polymerase aktivierende Transkriptionsfaktoren, um die Transkription zusammen  
mit dem basalen Transkriptionskomplex zu initiieren. Die Wirksamkeit der Promo-  
toren wird häufig durch zusätzliche DNA-Sequenzen, die Enhancer-Sequenzen,  
gesteigert und reguliert, deren Position im Gegensatz zu der der Promotoren nicht  
25 festgelegt ist. Diese regulatorischen Elemente können stromaufwärts, stromabwärts  
oder in einem Intron des zu exprimierenden Gens liegen.

- In der rekombinanten DNA-Technologie werden Promotoren in Expressionsvektoren  
eingesetzt, um die Expression eines Transgens zu steuern, das in der Regel nicht das  
30 natürlicherweise durch den Promotor regulierte Gen ist. Dabei kommt es wesentlich  
auf die Spezifität des Promoters an, die bestimmt, zu welchem Zeitpunkt, in welchen  
Gewebetypen und in welcher Intensität ein gentechnisch übertragenes Gen  
exprimiert wird.

RECEIVED AVAILABLE COPY

In der Pflanzenzucht wird die rekombinante DNA-Technologie häufig eingesetzt, um bestimmte nützliche Eigenschaften auf Nutzpflanzen zu übertragen, was zu einem höheren Ertrag, z. B. durch erhöhte Pathogenresistenz, oder zu verbesserten

- 5 Eigenschaften der Ernteprodukte führen soll. Dabei ist es häufig wünschenswert, dass das übertragene Gen nicht ubiquitär exprimiert wird, sondern nur in den Geweben, in denen die Transgenaktivität gewünscht wird, da sich die Anwesenheit des Transgenprodukts in manchen Geweben negativ auf normale physiologische Prozesse auswirken kann. So konnte etwa gezeigt werden, dass die Überexpression  
10 einer anionischen Peroxidase unter der Kontrolle des ubiquitär wirkenden 35S-Promotors zum Welken von transgenen Tabakpflanzen führt, weil weniger Wurzelwachstum stattfindet und sich daher auch weniger Wurzelmasse bildet (Lagrimini et al. (1997) The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. Plant Mol Biol. 33 (5), S. 887-895). Die  
15 Überexpression der spi2-Peroxidase unter der Kontrolle des ebenfalls ubiquitär wirkenden Ubiquitin-Promotors führt zu einer reduzierten Epicotylbildung und einem reduzierten Längenwachstum verglichen mit Kontrollpflanzen (Elfstrand, M. et al. (2001) Overexpression of the endogenous peroxidase-like gene spi 2 in transgenic Norway spruce plants results in increased total peroxidase activity and  
20 reduced growth. Plant Cell Reports 20 (7), S. 596-603). Abgesehen von negativen Effekten auf physiologische Prozesse soll in der Resistenzzüchtung häufig vermieden werden, dass das Transgenprodukt auch in den geernteten Pflanzenteilen vorliegt.

Deshalb wurden in den vergangenen Jahren Promotoren isoliert, die entweder  
25 gewebespezifisch oder induzierbar wirken. Zu den gewebespezifischen Promotoren gehören etwa samen-, knollen- und fruchtspezifische Promotoren. Die induzierbaren Promotoren können beispielsweise durch chemische Induktion, durch Lichtinduktion oder andere Stimuli aktiviert werden.

Es ist auch wünschenswert, die Genexpression spezifisch in der Epidermis zu modulieren. Die Epidermis stellt das Abschlussgewebe der oberirdischen Organe höherer Pflanzen dar. Als solches bestehen die Aufgaben der Epidermis darin, einerseits den Wasser- und Stoffaustausch der Pflanze zu ermöglichen und

- 5 andererseits das Eindringen von Pathogenen in die Pflanze zu verhindern. Durch eine veränderte Genexpression in der Epidermis mit Hilfe geeigneter Promotoren und von ihnen gesteuerter Gene könnten diese Funktionen gezielt moduliert werden. In dikotylen Pflanzen wurden epidermisspezifische Promotoren bereits beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass der Promotor des CER6- (CUT1-) Gens  
10 aus Arabidopsis, das für ein kondensierendes Enzym bei der Wachssynthese kodiert, die epidermisspezifische Expression eines  $\beta$ -Glucuronidase-Reportergens bewirken kann (Hooker et al. (2002), Significance of the expression of the CER6 condensing enzyme for cuticular wax production in Arabidopsis, Plant Physiol. 129(4), S. 1568-1580; Kunst et al. (2000), Expression of the wax-specific condensing enzyme CUT1  
15 in Arabidopsis, Biochem. Soc. Trans. 28(6), S. 651-654).

- Jedoch ist es bisher nicht gelungen, geeignete epidermisspezifische Promotoren in monokotylen Pflanzen, die sich für die Expression von Transgenen in Monokotylen, insbesondere Poaceen (Süßgräsern), besonders gut eignen, zu  
20 identifizieren. Deshalb wurden bisher konstitutive Promotoren wie der Ubiquitin-Promotor aus Mais verwendet, um Proteine in der Epidermis zu exprimieren (siehe z. B. Oldach et al. (2001), Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat, Mol Plant Microbe Interact. 14(7), S. 832-838). Dies kann aber, wie oben beschrieben, zu unerwünschten Nebeneffekten bei  
25 den transgenen Pflanzen aufgrund der Anwesenheit des Transgenprodukts in anderen Geweben bzw. Organen als der Epidermis führen.

- Aufgabe der Erfindung ist es daher, Mittel bereitzustellen, die eine epidermisspezifische Genexpression in Monokotylen, bevorzugt in  
30 Getreidepflanzen, ermöglichen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen charakterisierten Ausführungsformen.

- 5 Somit betrifft die vorliegende Erfindung eine Promotorregion mit Spezifität für die pflanzliche Epidermis, umfassend eine erste, aus dem Promotor des Gens Glutathion-S-Transferase A1 (GSTA1) stammende Sequenz, und eine zweite, aus dem Intron des Gens WIR1a stammende Sequenz. GSTA1 bezieht sich auf Gene, wie sie in Dudler et al. (1991), A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous  
10 to glutathione-S-transferases, Mol. Plant Microbe Interact. 4(1), S. 14-18 beschrieben sind. Insbesondere handelt es sich bei diesen Genen um Gene aus Weizen, es kann sich aber auch um homologe Gene aus anderen Getreidepflanzen, vor allem Gerste, mit vergleichbarem Expressionsmuster und ähnlichem Genprodukt handeln. WIR1a bezeichnet Gene, wie sie in Bull et al. (1992), Sequence and expression of a wheat  
15 gene that encodes a novel protein associated with pathogen defense, Mol. Plant Microbe Interact. 5(6), S. 516-519, beschrieben sind.

Bevorzugt handelt es sich bei der ersten Sequenz um SEQ ID Nr. 1 und bei der zweiten Sequenz um SEQ ID Nr. 2.

- 20 Zwischen der ersten und der zweiten Sequenz können weitere, untranslatierte Sequenzen liegen, die eine Länge von 10bp bis 1000bp, bevorzugt von 20bp bis 800bp, besonders bevorzugt von 30bp bis 500bp und am meisten bevorzugt zwischen 40bp und 300bp aufweisen.

- 25 Besonders bevorzugt handelt es sich bei der erfindungsgemäßen Promotorregion um eine Promotorregion, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus  
a) Promotorregionen, die die unter SEQ ID Nr. 3 angegebene Nukleinsäuresequenz umfassen;

- 5 -

- b) Promotorregionen, die einen funktionalen Teil der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz umfassen oder
  - c) Promotorregionen, die eine Sequenz aufweisen, die unter stringenten Bedingungen
- 5 mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz hybridisiert.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter einer Promotorregion eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die die zur Expression einer kodierenden Sequenz (Transgen) notwendigen regulatorischen Sequenzen umfasst. Regulatorische Sequenzen bilden denjenigen Teil eines Gens, der die Expression einer kodierenden Sequenz bestimmt, also vor allem das Expressionsniveau und -muster. Die regulatorischen Sequenzen besitzen mindestens ein Sequenzmotiv, an das spezifische Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase binden, zum 15 Transkriptionskomplex assemblieren und die Transkription der von der Promotorregion kontrollierten Nukleinsäuresequenz wirksam initiieren.

Die erfindungsgemäßen Promotorregionen basieren auf der Beobachtung, dass durch Fusion des Promotors des GSTA1-Gens aus Weizen mit intronischen Sequenzen des WIR1a-Gens aus Weizen Promotoren mit neuen Eigenschaften hergestellt werden 20 können.

In transienten Reporterassays in Weizenblättern mit einem β-Glucuronidase-(GUS)-Gen aus *E. coli* als Reportergen wurden verschiedene Kombinationen des 25 WIR1a-Promotors und -Introns und des GST-Promotors getestet. Es zeigte sich überraschenderweise, dass GST-Promotor und WIR1a-Intron einen synergistischen Effekt auf die Reporter-Aktivität ausüben. Die Steigerung der transkriptionellen Aktivität war vergleichbar mit der durch den ubiquitär exprimierten 35S-Promotor erzielten transkriptionellen Aktivität.

Unter dem Begriff „epidermisspezifisch“ wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung verstanden, dass eine unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotorregion stehende Nukleinsäuresequenz in der SprossEpidermis von Pflanzen exprimiert wird. Insbesondere ist Epidermisspezifität im Sinne der vorliegenden

- 5 Erfindung auch dann gegeben, wenn die erfindungsgemäße Promotorregion die Expression eines Fremdgens in der Epidermis im Vergleich zu anderen Zelltypen begünstigt und in der Epidermis eine signifikant, wie mindestens 2-fach, bevorzugt mindestens 5-fach und besonders bevorzugt mindestens 10- und am meisten bevorzugt 50-fach gegenüber anderen Zelltypen erhöhte Expression bewirkt. Die  
10 Expressionshöhe kann mit üblichen *in situ*-Nachweistechniken bestimmt werden.

Der Begriff „pflanzliche Epidermis“ ist dem Fachmann geläufig. Ergänzende Informationen sind in jedem Pflanzenanatomie- oder -physiologiebuch zu finden, wie etwa in Strasburger, Lehrbuch der Botanik, 35. Auflage 2002, Spektrum

- 15 Akademischer Verlag.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass eine Promotorregion, die sowohl regulatorische Sequenzen aus dem GSTA1-Gen aus Weizen als auch Intron-Sequenzen aus dem WIR1a-Gen aus Weizen umfasst, eine epidermisspezifische

- 20 Expression einer unter ihrer Kontrolle stehenden kodierenden Nukleinsäuresequenz bewirkt.

Neben einer Promotorregion, die die unter SEQ ID Nr. 3 dargestellten Nukleinsäuresequenzen aufweist, betrifft die vorliegende Erfindung auch Promotorregionen, die

- 25 die funktionalen Teile dieser Sequenz aufweisen und die in Pflanzen eine epidermisspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten kodierenden Nukleinsäuresequenz bewirken.

Unter einem „funktionalen Teil“ werden in diesem Zusammenhang Sequenzen

- 30 verstanden, an die der Transkriptionskomplex trotz leicht abweichender

Nukleinsäuresequenz noch binden und epidermisspezifische Expression bewirken kann. Funktionale Teile einer Promotorsequenz umfassen auch solche Promotorvarianten, deren Promotoraktivität, verglichen mit dem Wildtyp, abgeschwächt oder verstärkt ist. Unter einem funktionalen Teil versteht man

5 insbesondere auch natürliche oder künstliche Varianten der in SEQ ID Nr. 3 angegebenen Sequenz der Promotorregion. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen und/oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Funktionale Teile der Promotorregionen umfassen im Rahmen der vorliegenden Erfindung natürlich vorkommende Varianten der SEQ ID Nr. 3 sowie

10 künstliche, z. B. durch chemische Synthese erhaltene Nukleotidsequenzen.

Der verwendete Promotor enthält in jedem Fall eine TATA-Box (Positionen 2163 bis 2169 in SEQ ID Nrn. 1 und 3) und bevorzugt auch zwei CAAT-Boxen (Positionen 1047 bis 1051 bzw. 1895 bis 1899 in SEQ ID Nrn. 1 und 3). Weiterhin ist

15 mindestens eines, bevorzugt mindestens zwei und drei, besonders bevorzugt mindestens vier, fünf und sechs, und am meisten bevorzugt sieben und acht der folgenden Sequenzmotive im Promotor enthalten:

- a) GTGGGGG
- 20 b) ACGTGGA
- c) TCCACCT
- d) TATCCAT
- e) CATGCATG
- f) TGTAAAG
- 25 g) CCTACCA
- h) AATAGTA

Bevorzugt liegen die Sequenzmotive an den Positionen, die den folgenden Positionen in SEQ ID Nrn. 1 und 3 entsprechen:

- 8 -

- a) 185-191 und 217-223bp
  - b) 455-461bp
  - c) 508-514bp
  - d) 564-570bp
  - 5      - e) 1514-1521bp
  - f) 1520-1526bp
  - g) 1569-1575bp
  - h) 1610-1616bp
- 10     Gemessen werden kann die Promotoraktivität von Varianten der Promotorregion mit Hilfe von Markergenen, deren kodierende Sequenz unter der Kontrolle der zu untersuchenden Promotorregion steht. Geeignete Markergene sind beispielsweise das  $\beta$ -Glucuronidase-(GUS)-Gen aus *E. coli*, ein Fluoreszenzgen wie etwa das Green-Fluorescence-Protein (GFP)-Gen aus *Aequoria victoria*, das Luziferase-Gen aus *Photinus pyralis* oder das  $\beta$ -Galaktosidase-(lacZ)-Gen aus *E. coli*. Die absolute Promotoraktivität wird bestimmt durch Vergleich mit einer Wildtyp-Pflanze. Die Gewebe- bzw. Zellspezifität lässt sich leicht durch Vergleich der Expressionsraten der oben genannten Markergene in den jeweiligen Geweben bzw. Zellen bestimmen.
- 15     Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls Promotorregionen mit einer Nukleinsäuresequenz, die mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Der Begriff „Hybridisierung unter stringenten Bedingungen“ bedeutet im Zusammenhang dieser Erfindung, dass die Hybridisierung *in vitro* unter Bedingungen durchgeführt wird, die stringent genug sind, um eine spezifische Hybridisierung zu gewährleisten. Solche stringenten Hybridisierungsbedingungen sind dem Fachmann bekannt und können der Literatur entnommen werden (Sambrook et al. (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).
- 20     25

Allgemein bedeutet "spezifisch hybridisieren", dass ein Molekül unter stringenten Bedingungen präferenziell an eine bestimmte Nukleotidsequenz bindet, wenn diese Sequenz in einem komplexen Gemisch von (z. B. Gesamt-) DNA oder RNA vorliegt.

- Der Begriff „stringente Bedingungen“ steht allgemein für Bedingungen, unter denen 5 eine Nukleinsäuresequenz präferenziell an ihre Zielsequenz hybridisieren wird, und zu einem deutlich geringeren Ausmaß oder gar nicht an andere Sequenzen.

Stringente Bedingungen sind z. T. Sequenz-abhängig und werden unter verschiedenen Umständen unterschiedlich sein. Längere Sequenzen hybridisieren spezifisch bei höheren Temperaturen. Im Allgemeinen werden stringente

- 10 Bedingungen so ausgewählt, dass die Temperatur etwa 5°C unter dem thermischen Schmelzpunkt ( $T_m$ ) für die spezifische Sequenz bei einer definierten Ionenstärke und einem definierten pH liegt. Die  $T_m$  ist die Temperatur (unter definierter Ionenstärke, pH und Nukleinsäurekonzentration), bei der 50% der zu der Zielsequenz komplementären Moleküle zu der Zielsequenz im Gleichgewichtszustand 15 hybridisieren. Typischerweise sind stringente Bedingungen solche, bei denen die Salzkonzentration mindestens ungefähr 0,01 bis 1,0 M Natriumionen-Konzentration (oder ein anderes Salz) bei einem pH zwischen 7,0 und 8,3 beträgt und die Temperatur mindestens 30 °C für kurze Moleküle (also z. B. 10-50 Nukleotide) beträgt. Zusätzlich können stringente Bedingungen durch Zugabe destabilisierender 20 Agenzien, wie beispielsweise Formamid, erreicht werden.

Geeignete stringente Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise auch beschrieben in Sambrook et al., vide supra. So kann die Hybridisierung etwa unter den folgenden Bedingungen stattfinden:

- 25 - Hybridisierungspuffer: 2x SSC, 10x Denhardt's Lösung (Fikoll 400 + PEG + BSA; Verhältnis 1:1:1), 0,1% SDS, 5mM EDTA, 50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 250µg/ml Heringssperma-DNA; 50µg/ml tRNA oder 0,25M Natriumphosphatpuffer pH 7,2, 1mM EDTA, 7% SDS bei einer Hybridisierungstemperatur von 65°C bis 68°C

- 10 -

- Waschpuffer: 0,2x SSC, 0,1% SDS bei einer Waschtemperatur von 65°C bis 68°C

- Vorzugsweise weisen derartige Promotorvarianten eine Sequenzidentität von
- 5 mindestens 50%, bevorzugt mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 90% und am meisten bevorzugt mindestens 95% zu der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Promotorsequenz oder Teilen davon auf, bezogen auf die gesamte in SEQ ID Nr. 3 gezeigte DNA-Sequenz. Vorzugsweise wird die Sequenzidentität derartiger Promotorsequenzen durch Vergleich mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen
- 10 Nukleinsäuresequenz bestimmt. Wenn zwei unterschiedlich lange Nukleinsäuresequenzen miteinander verglichen werden, bezieht sich die Sequenzidentität vorzugsweise auf den prozentualen Anteil der Nukleotidreste der kürzeren Sequenz, die identisch sind mit den entsprechenden Nukleotidresten der längeren Sequenz.
- 15 Sequenzidentitäten werden üblicherweise über verschiedene Alignment-Programme, wie z. B. CLUSTAL festgestellt. Allgemein stehen dem Fachmann zur Bestimmung der Sequenzidentität geeignete Algorithmen zur Verfügung, z. B. auch das Programm, das unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (z. B. der Link „Standard
- 20 nucleotide-nucleotide BLAST [blastn]“) zugänglich ist.
- Die oben für SEQ ID Nr. 3 angegebenen prozentualen Identitätsgrade gelten ebenso für die in SEQ ID Nrn. 1 und 2 gezeigten ersten und zweiten Sequenzen der erfindungsgemäßen Promotorregion.
- 25 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist die erfindungsgemäße Promotorregion die gesamte unter SEQ ID Nr. 3 angegebene Sequenz von 2552 Nukleotiden auf.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch chimäre Gene aus der erfindungsgemäßen Promotorregion und einer kodierenden Sequenz, deren Expression, die natürlicherweise nicht durch die erfindungsgemäßen Promotorregion reguliert wird, im chimären Gen durch die erfindungsgemäße Promotorregion reguliert wird, in 5 operativer Verknüpfung sowie rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die diese chimären Gene enthalten.

- Der Begriff „Nukleinsäuresequenz, deren Expression durch die erfindungsgemäße Promotorregion reguliert wird“ bedeutet, dass die Expression der 10 Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotorregion in den Zellen, in denen die Promotorregion aktiv ist, um mindestens den Faktor fünf, bevorzugt mindestens den Faktor 10 und besonders bevorzugt mindestens den Faktor 50 gegenüber Wildtyp-Zellen gesteigert werden kann.
- 15 Bei der Nukleinsäuresequenz, deren Expression durch die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz reguliert wird, kann es sich um die kodierende Region eines Transgens handeln, z. B. eines Resistenzgens, dessen Genprodukt in der Epidermis erwünscht ist. Durch die Expression des Transgens kann der Gehalt des von ihm kodierten Genprodukts mindestens um den Faktor 2, bevorzugt mindestens um den 20 Faktor 5, besonders bevorzugt mindestens um den Faktor 10 und am meisten bevorzugt mindestens um den Faktor 50 erhöht werden.

Die erfindungsgemäße Promotorregion kann aber auch in RNAi-Konstrukten zur RNA-Interferenz eingesetzt werden, um das epidermisspezifische Silencing 25 bestimmter Gene zu erreichen, deren Genprodukte in der Epidermis nicht oder in geringerem Ausmaß als üblich anwesend sein sollen. Letzteres kann natürlich auch mit klassischen antisense- oder Kosuppressionskonstrukten unter Einsatz der erfindungsgemäßen Promotorregionen erreicht werden. Die Expression des endogenen Gens wird durch die Silencing-Konstrukte um mindestens 50%,

bevorzugt um mindestens 70%, besonders bevorzugt um mindestens 90% und besonders bevorzugt um mindestens 95% verringert.

In einem Konstrukt, das zur RNA-Interferenz verwendet werden soll, liegen

- 5 üblicherweise palindromische DNA-Sequenzen vor, die nach der Transkription doppelsträngige RNA bilden. Diese doppelsträngige RNA wird durch das Dicer-Enzym zu kürzeren RNA-Stücken prozessiert, die an eine endogene RNA binden und deren Abbau mit Hilfe des RISC (RNA-induced silencing complex) bewirken (Hannon (2002) RNA interference, Nature, Bd. 418, S. 244-251).

10

Der Effekt der Gen-Silencing-Konstrukte auf die Expression des endogenen Gens kann mit Hilfe gängiger molekularbiologischer Methoden nachgewiesen werden, die dem Fachmann wohl bekannt sind. So stehen zur Untersuchung des RNA-Levels Northern-Blot- und RT-PCR-Verfahren zur Verfügung, das Protein kann durch 15 Western-Blot-Analysen, Immunfluoreszenzen oder, sofern es sich bei dem Protein um ein Enzym handelt, Enzymassays nachgewiesen werden.

Unter dem Begriff „Transgen“ werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung diejenigen Gene zusammengefasst, deren Genprodukte in der Epidermis

- 20 bereitgestellt werden sollen, bzw. beim Gen-Silencing unterdrückt werden sollen.

Bei der Nukleinsäuresequenz, deren Expression unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promoters steht, handelt es sich bevorzugt um eine Nukleinsäuresequenz, die Pathogenresistenz vermittelt, da die Epidermis die erste

- 25 Barriere darstellt, die von einem Pathogen beim Eindringen in die Pflanze überwunden werden muss.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff „rekombinantes Nukleinsäuremolekül“ ein Vektor verstanden, der ein erfindungsgemäßes chimäres

- 30 Gen oder eine erfindungsgemäße Promotorregion enthält und die promotor-

abhängige Expression der unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotorregion stehenden Nukleinsäuresequenz in Pflanzenzellen und Pflanzen bewirken kann. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nukleinsäuremolekül zusätzlich transkriptionelle

- 5 Terminationssequenzen. Unter „transkriptionellen Terminationssequenzen“ werden dabei DNA-Sequenzen verstanden, die am Stromabwärts-Ende einer kodierenden Sequenz liegen und die RNA-Polymerase zum Stoppen der Transkription veranlassen.
- 10 Weiterhin betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen mit epidermisspezifischer Expression einer durch die erfindungsgemäße Promotorregion regulierten Nukleinsäuresequenz, umfassend die Schritte:
- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls, in der die erfindungsgemäße Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer 15 kodierenden Sequenz vorliegt,
- b) Übertragung des Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen und
- c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.
- 20 Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen bzw. deren Zellen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E. coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Das chimäre Gen kann an einer passenden 25 Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird dann für die Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E. coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet und anschließend geerntet und lysiert, und das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethoden zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen 30 Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiolo-

gische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und daraus gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden.

- 5 Wie bereits erwähnt, stehen für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung, wobei der Fachmann die jeweils geeignete Methode ohne Schwierigkeiten ermitteln kann. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als
- 10 Transformationsmedium, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation, den direkten Gentransfer isolierter DNA in Protoplasten, die Einbringung von DNA mittels biolistischer Methoden sowie weitere Möglichkeiten, die bereits seit mehreren Jahren gut etabliert sind und zum üblichen Repertoire des Fachmanns in der pflanzlichen Molekularbiologie bzw. Pflanzenbiotechnologie
- 15 gehören. Die biolistische Gentransfermethode wird vor allem bei monokotyledonen Pflanzen verwendet. Hier findet der Fachmann nützliche Informationen zur Durchführung z.B. in Vasil et al. (1992) Bio/Technology, 10, S. 667-674; Vasil et al. (1993) Bio/Technology, 11, S. 1153-1158; Nehra et al. (1994) Plant J. 5, S. 285-297; Becker et al. (1994) Plant J., 5, S. 299-307; Altpeter et al. (1996) Plant Cell Reports 16, S. 12-17; Ortiz et al. (1996) Plant Cell Reports 15, S. 877-81; Rasco-Gaunt et al. (2001) J. Exp. Bot. 52; S. 865-874.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden per se keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Ähnliches gilt  
25 für den direkten Gentransfer. Es können einfache Plasmide, wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden.

Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens empfehlenswert. Dem Fachmann

sind die gängigen Selektionsmarker bekannt, und es stellt für ihn kein Problem dar, einen geeigneten Marker auszuwählen.

- Je nach Einführungsmethode der gewünschten Gene in die Pflanzenzelle können
- 5 weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Wird z.B. zur Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muss mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der im Ti- bzw. Ri-Plasmid enthaltenen T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden. Werden zur Transformation Agrobakterien verwendet, muss die
- 10 einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA
- 15 notwendige *vir*-Region. Intermediäre Vektoren können allerdings nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helperplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren dagegen können sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker, welche von
- 20 der rechten und linken T-DNA-Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden. Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid enthalten, welches das chimäre Gen innerhalb der T-DNA trägt, welche in die Pflanzenzelle übertragen wird. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von
- 25 Pflanzenzellen verwendet. Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in allseits bekannten Übersichtsartikeln und Handbüchern zur Pflanzentransformation beschrieben worden. Für monokotyledone Pflanzen müssen für einen effektiven Agrobakterium-vermittelten Gentransfer abgewandelte Protokolle angewandt werden, wie sie etwa in
- 30 Cheng et al. (1997) Plant Physiol. 115, S. 971-980; Khanna and Daggard (2003)

Plant Cell Reports 21, S. 429-436; Wu et al. (2003) Plant Cell Reports 21, S. 659-668; Hu et al. (2003) Plant Cell Reports 21, S. 1010-1019, beschrieben sind. Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes*

- 5 kultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden.

- 10 Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder 15 einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, Methotrexat, Glyphosat, Streptomycin, Sulfonylharnstoff, Gentamycin oder Phosphinotricin u.a. vermittelt. Der individuell gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten. Hierzu sind auch alternative Marker geeignet, wie nutritive Marker oder Screeningmarker (wie 20 GFP, green fluorescent protein). Selbstverständlich kann auch vollkommen auf Selektionsmarker verzichtet werden, was allerdings mit einem ziemlich hohen Screeningbedarf einhergeht. Falls markerfreie transgene Pflanzen erwünscht sind, stehen dem Fachmann auch Strategien zur Verfügung, die eine nachträgliche Entfernung des Markergens erlauben, z.B. Cotransformation oder Sequenz- 25 spezifische Rekombinasen.

Die Regeneration der transgenen Pflanzen aus transgenen Pflanzenzellen erfolgt nach üblichen Regenerationsmethoden unter Verwendung bekannter Nährmedien. Die so erhaltenen Pflanzen können dann mittels üblicher Verfahren, einschließlich

- 30 molekularbiologischer Methoden, wie PCR, Blot-Analysen, auf Anwesenheit und

Gewebespezifität der eingeführten Nukleinsäuresequenz, deren Expression von dem erfindungsgemäßen Promotor kontrolliert wird, bzw. der von ihr beeinflussten endogenen RNAs und Proteine untersucht werden.

- 5 Ferner betrifft die Erfindung transgene Pflanzen, die eine durch die erfindungsgemäße Promotorregion regulierte Nukleinsäuresequenz enthalten und diese epidermisspezifisch exprimieren.

Bei den erfindungsgemäßen Pflanzen handelt es sich bevorzugt um 10 Monokotyledonen, insbesondere Getreidepflanzen wie Roggen, Mais und Hafer, besonders bevorzugt um Weizen oder Gerste, sowie transgene Teile dieser Pflanzen und deren transgenes Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, sowie die transgenen Nachkommen dieser Pflanze. Aber auch für andere Poaceen (Süßgräser) wie z. B. Futtergräser kann die 15 erfindungsgemäße Promotorregion zur Herstellung entsprechender Pflanzen mit epidermisspezifischer Expression von Transgenen eingesetzt werden.

Unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen, epidermisspezifischen Promoters können Gene für die Produktion epikutikulärer Wachse exprimiert werden, um die 20 Trockenheitstoleranz der Pflanzen zu erhöhen. Außerdem können unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promoters Gene für die Produktion von Anthocyanaen oder anderen UV-absorbierenden Substanzen zur Erhöhung der UV-Resistenz exprimiert werden. Wie oben bereits ausgeführt, werden bevorzugt Pathogen-Resistenzgene unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promoters exprimiert.

25

Als Pflanzenpathogene werden unter anderem Bakterien, Viren und Pilze bezeichnet, die Pflanzen infizieren und dadurch den Stoffwechsel der Pflanze negativ beeinflussen.

Zu diesen Pflanzenpathogenen gehören Pilze, die bei Getreidepflanzen wie Weizen und Gerste unter anderem die Krankheiten Echter Mehltau und Halmbruchkrankheit auslösen. Diese Krankheiten können abhängig von der Befallsstärke erhebliche Ertragsverluste (bis zu 50%) verursachen.

5

Traditionell werden die oben genannten sowie weitere pflanzliche Pilzerkrankungen durch den Einsatz von Fungiziden bekämpft, die die bekannten Nachteile, wie Grundwassergängigkeit und Akkumulation in der Nahrungskette, besitzen.

10 In den letzten Jahren wurden aber auch einige Gene identifiziert, die Resistenz gegen einen bestimmten oder gegen mehrere Erreger vermitteln können. Der Begriff „Vermittlung von Pathogenresistenz“, wie er hier verwendet wird, bedeutet, dass Pflanzen, in denen die Expression der besagten Gene erhöht ist, gegenüber Pflanzen, in denen die Expression der besagten Gene normal ist, weniger empfänglich für die 15 Infektion mit bestimmten Pathogenen sind. Zu den Genen, die Pathogenabwehr vermitteln, gehören auch solche Gene, deren Expression durch Infektion mit einem Pathogen angeschaltet wird.

Zu diesen Genen gehören Peroxidasen und Oxalat-Oxidasen. Die Oxalat-Oxidasen, 20 die zu der Familie der germinartigen Proteine gehören, katalysieren die Oxidation von Oxalat, wodurch Wasserstoffperoxid entsteht. Das Wasserstoffperoxid wirkt mikrobizid und kann die Lignifizierung der Zellwände fördern, wodurch das Eindringen von Schädlingen verhindert wird. Außerdem kann es in geringen Konzentrationen hypersensitiven Zelltod hervorrufen. Die Peroxidasen verwenden 25 entweder molekularen Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid, um zelluläre Substrate zu oxidieren und dadurch zu entgiften.

Pathogene, gegenüber denen die Expression der Oxalat-Oxidasen und Peroxidasen in der Epidermis von Pflanzen Resistenz vermitteln kann, schließen zum Beispiel ein: 30 Echter Mehltau, Fusarium spp., Rynchosporium secalis und Pyrenophora teres.

Weitere Gene, die in der Lage sind, Resistenz gegen Pathogene zu vermitteln, sind Chitinasen, Ag-APP, GSTA1 und WIR1a.

Durch die Expression der für diese Enzyme kodierenden Nukleinsäuresequenz in der  
5 Epidermis von transgenen Pflanzen mit Hilfe der erfindungsgemäßen  
Promotorregion können Pflanzen mit erhöhter Pathogenresistenz erhalten werden.

Im Gegensatz zu den Pathogenresistenz vermittelnden Genen gibt es auch  
pflanzeneigene Gene, die das Eindringen eines Pathogens fördern. Zu diesen gehört  
10 das Mlo-Gen, das für einen Sieben-Transmembran-Rezeptor kodiert, der das  
Eindringen des Mehltau-Pilzes in die Epidermis zu fördern scheint. In diesem Fall ist  
es sinnvoll, mit der Expression des Mlo-Gens zu interferieren, um das Eindringen  
von Pilzen in die Pflanze zu verhindern. Dies kann z. B. mit Hilfe der oben  
beschriebenen RNAi-Methode erfolgen. Dass die Interferenz mit der Expression des  
15 Mlo-Gens geeignet ist, das Eindringen des Mehltaupilzes in die Pflanze zu  
verhindern, wurde in vitro an Blattsegmenten aus Gerste gezeigt, die mit Wolfram-  
Teilchen beschossen wurden, die mit Mlo-dsRNA beschichtet worden waren  
(Schweizer et al. (2000), Double-stranded RNA interferes with gene function at the  
single-cell level in cereals, The Plant Journal, 24 (6), S. 895-903). Jedoch konnte  
20 bisher nicht gezeigt werden, dass die epidermis-spezifische Interferenz mit der Mlo-  
Expression in transgenen Pflanzen den gleichen Effekt hat.

Weitere pflanzliche Gene, die die Interaktion eines Pathogens mit der Pflanze  
vermitteln und dadurch das Eindringen des Pathogens in die Pflanze fördern können,  
25 sind beispielsweise Aminosäuren- oder Zuckertransporter oder Invertasen. Diese  
Gene eignen sich ebenfalls als Angriffspunkte für das Gen-Silencing.  
Somit betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung pathogen-  
resistenter Pflanzen, umfassend die Schritte:

- 20 -

- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls, in dem der erfundungsgemäße Promotor in operativer Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz, die Pathogenresistenz vermittelt, vorliegt,
- b) Übertragung des rekombinanten Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen und
- c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.

Bevorzugt handelt es sich bei der Pathogenresistenz vermittelnden

- Nukleinsäuresequenz um die kodierende Region eines Peroxidase- oder Oxalat-Oxidase-Gens oder um eine Sequenz, die mit der endogenen Mlo-RNA interferiert.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung und sollten nicht einschränkend verstanden werden.

15

**Abbildungen:**

- 1) Nukleinsäuresequenz des GSTA1-Promotors (SEQ ID Nr. 1)
- 20 2) Nukleinsäuresequenz des WIR1a-Introns (SEQ ID Nr. 2)
- 3) Nukleinsäuresequenz der bevorzugten Promotorregion (SEQ ID Nr. 3)
- 4) Nukleinsäuresequenz der TAPERO (Peroxidase) cDNA (SEQ ID Nr. 4)
- 25 5) TAPERO-Expressionsvektor pPS41
  - a) Nukleinsäuresequenz (SEQ ID Nr. 5)
  - b) Vektorkarte

- 21 -

- 6) Nukleinsäuresequenz der Germin 9f-2.8 (Oxalat-Oxidase) cDNA (SEQ ID Nr. 6)
- 7) Germin-Expressionsvektor pPS24
- 5 a) Nukleinsäuresequenz (SEQ ID Nr. 7)  
b) Vektorkarte
- 8) Sequenz des Mlo-RNAi-Konstrukts (SEQ ID Nr. 8)
- 10 ..... 9) Mlo-RNAi-Expressionsvektor pWIR5-TaMlo-RNAi
  - a) Nukleinsäuresequenz (SEQ ID Nr. 9)
  - b) Vektorkarte
- 15 10) *In situ* Oxalatoxidase-Aktivität in pPS24-transgenen Pflanzen  
Blätter von Bobwhite Wildtyppflanzen (BW) und von transgenen Linien Nr. 157 und Nr. 170 wurden quergeschnitten und die Oxalatoxidase-Aktivität *in situ* nachgewiesen. Linke Spalte = Reaktion mit Oxalat-Substrat; rechte Spalte = Kontrollreaktion ohne Oxalat-Substrat. Die starke Violettfärbung zeigt Oxalatoxidase-Aktivität in der Epidermis der transgenen Linien an.
- 20 11) Nachweis des TAPERO-Transgens in pPS41-transgenen Pflanzen
  - a) im Northern Blot  
Nachweis der Akkumulation von TAPERO RNA mittels Hybridisierung einer WIR3 Probe an Northern blots aus transgenen Weizenlinien der T2 Generation, die das pPS41 Konstrukt tragen. Es wurden je 2 Sublinien von 4 ausgewählten Linien plus Wildtyp (BW) im Adultpflanzenstadium analysiert. Blatt 1 = Fahnenblatt. Blätter 2-4 = zunehmend älter. Die TaGer-4 Sonde hybridisiert an eine Gruppe von stressinduzierten Weizengenen und wurde verwendet, um pleiotrope Nebeneffekte der TAPERO-Überexpression zu testen. Keine signifikante Nebenwirkung wurde gefunden. EtBr = Beladungskontrolle der Gele, gefärbt mit Ethidiumbromid.

b) im Western Blot

Nachweis der Akkumulation des TAPERO-Proteins mittels Antikörperreaktion auf Western Blots von transgenen Weizenlinien der T2 Generation, die das pPS41

- 5 Konstrukt tragen. Das TAPERO-Transgenprodukt hat die erwartete Grösse von 31 kD. In Bobwhite, Blatt 3 ist eine erhöhte Basalaktivität des TAPERO Gens zu beobachten. Blatt 1 = Fahnenblatt. Coomassie stain = Ladungskontrolle der Gele, gefärbt mit Coomassie Blau R250.

10 12) Nachweis der epidermisspezifischen Transgenexpression

A) durch Northern Blot-Analyse

Nachweis der Anhäufung von Oxalatoxidase- (links) und TaPERO (rechts)-mRNA in der Blattepidermis von transgenen Pflanzen, die das pPS24- bzw. das pPS41-Konstrukt tragen, mit spezifischen Sonden. W = RNA aus ganzem Blatt; E = RNA aus Blattepidermis. EtBr = Ethidiumbromid gefärbtes Gel als Ladungskontrolle; 26S RNA = Nachhybridisierung des Blots mit einer Sonde gegen die 26S ribosomale RNA als Ladungskontrolle.

B) durch Real-time reverse PCR-Analyse

- 20 Es wurde die Konzentration der TaPERO mRNA in Gesamtblatt und Epidermis der transgenen Linie Nr. 2013 (transformiert mit dem Konstrukt pPS41) bestimmt. Die Daten wurden anhand der konstitutiv exprimierten Kontrollgene UBC (Ubiquitin konjugierendes Enzym) und GAPDH (Glyceraldehyd-Phosphat Dehydrogenase) normalisiert. Die im Gesamtblatt verbleibende Expression stammt aus der nicht-abgezogenen oberen Blattepidermis und aus dem Phloem (Nebenaktivität des Promotors).

C) durch Real-time reverse PCR-Analyse

- Es wurden Wildtyp-Pflanzen (Bobwhite) und die transgenen Linien Nr. 2013 und Nr. 30 2151 (transformiert mit dem pPS 41-Konstrukt) im Adultpflanzenstadium analysiert.

Der Promotor wird vor allem in Blättern und Ähren stark exprimiert. In Stengel und Wurzeln wird das Transgen nicht oder nur schwach exprimiert.

- 13) Untersuchung der Mehltau-Resistenz von pPS41-transgenen Pflanzen
- 5 Das Fahnenblatt adulter Pflanzen wurde abgeschnitten und in einem „detached leaf assay“ mit Weizenmehltau inkokuliert, zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen. 7 Tage nach Inkulation wurde der Mehltaubefall bonitiert. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Inkulationsexperimenten mit Pflanzen der T2 und T3 Generation.
- Sublinie 2088/2 exprimiert kein TAPERO und ist nicht erhöht resistent. Mittelwert
- 10 "non-silenced" = Mittelwert aus allen Linien außer 2088/2 und allen Experimenten.

- 14) Sprosswachstum von pPS41-transgenen Pflanzen
- Pflanzen der T2 Generation wurden zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen ausgesät und im Adultpflanzenstadium fotografiert.
- 15

- 15) Untersuchung der Mehltau-Resistenz von pWIR5-TaMlo-RNAi-transgenen Pflanzen
- Das Fahnenblatt adulter Pflanzen der T2 Generation wurde abgeschnitten und in einem „detached leaf assay“ mit Weizenmehltau inkokuliert, zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen. 7 Tage nach Inkulation wurde der Mehltaubefall bonitiert. Je 2 Sublinien pro Linie wurden getestet.

- Beispiele:**
- 25
- In den nachfolgenden Beispielen wurden molekularbiologische Standardmethoden wie *E.coli* Transformation, Restriktionsverdau, Ligation, DNA Extraktion, PCR etc., wie sie im Stand des Technik bekannt sind, gemäss Sambrook et al. (2001), vide supra, durchgeführt. Für alle PCR-Reaktionen wurde „proofreading“ *Pwo* Polymerase (Roche) verwendet.

1) Herstellung des Promotorkonstruktes aus GSTA1-Promotor und WIR1a-Intron  
(pPS18)

- Die Herstellung erfolgte mehrstufig über folgende Vorläuferkonstrukte: pPS1, pPS3,  
5 pPS15. Alle Konstrukte enthielten das GUS Reportergen, um sie direkt im  
transienten Assay testen zu können.

pPS1:

Ein 1.9 kb Promotorfragment des WIR1a Gens wurde mit *PstI* aus einem  
10 rekombinanten pBluescript Klon herausgeschnitten und in die *PstI*-Schnittstelle einer  
Expressionskassette vor das GUS-Gen kloniert. Die Expressionskassette basierte auf  
pBluescript und enthielt das GUS-Gen gefolgt vom Transkriptionsterminator des  
Weizen GSTA1-Gens. Da das GUS-Gen und der GSTA1-Transkriptionsterminator  
in den verwendeten finalen Konstrukten (siehe Beispiel 2) nicht mehr enthalten sind,  
15 wird auf eine detaillierte Beschreibung dieser Expressionskassette verzichtet. Das  
resultierende Konstrukt enthält eine translationelle WIR1a::GUS Fusion.

pPS3:

Mit den Adaptor-Primern 5' ATA TAT CTG CAG GGA GCC ACG GCC GTC  
20 CAC und 5' TAT CCC GGG CCC GTG CCT GGA CGG GAA wurde ein PCR  
Fragment von ca. 240 bp erzeugt und dessen Enden mit *SmaI* und *PstI* geschnitten  
(auf Adaptor). Als PCR „template“ diente der genomische WIR1a Klon. Das PCR  
Fragment enthält die letzten 15 Aminosäuren des ersten Exons von WIR1a und das  
Intron inklusive „splice site“ Akzeptor und wurde in pPS1, geschnitten mit *PstI*  
25 (partiell) und *SmaI* und über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt, ligiert. Das  
resultierende Konstrukt enthält eine translationelle WIR1a::GUS Fusion mit dem  
WIR1 Intron vor dem GUS Gen. Zudem wurde eine Deletion von Aminosäuren Nr.  
18-35 des ersten Exons von WIR1a eingeführt, um die Sekretion des WIR1a::GUS  
Fusionsproteins (durch Entfernen des Signalpeptids) zu verhindern.

pPS15:

Der WIR1a Promotor wurde durch ein PCR-Fragment des GSTA1-Promotors ersetzt. Zu diesem Zweck wurde pPS3 mit *Xba*I und *Sna*BI (partiell) verdaut und die Vektorbande über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Das GSTA1-

- 5 Promotorfragment von ca. 2.3 kb Länge wurde mit den Adaptor-Primern 5'ATA TAT CTC GAG TCT AGA ACT AGT GGA TCC und 5'ATA TAT TAC GTA GTT TGT CCG TGA ACT TCA aus dem genomischen GSTA1 Klon mittels PCR amplifiziert und an den Enden mit *Xba*I und *Sna*BI geschnitten. Das PCR Fragment wurde mit der geleluuierten pPS3 Bande ligiert, resultierend in einer translationellen  
10 Fusion des intronenthaltenden WIR1a Genfragmentes mit GUS, unter der Kontrolle des GSTA1 Promotors.

pPS18:

pPS15 wurde mit *Pst*I und *Sna*BI (partiell) verdaut, die Vektorbande über Agarose-

- 15 Gelelektrophorese gereinigt und mit einem doppelsträngigen Oligonukleotid (5'GTA CAC AGG CAG CTA GCT CTC GAA ACC TCG CTC GAA ACG CA plus 5'CAT GTG TCC GTC GAT CGA GAG CTT TGG AGC GAG CTT TGC GT) ligiert. Dies ersetzte den Teil des WIR1a Gens um den Translationsstart (46 bp upstream bis 53 bp downstream des Translationsstarts) mit 42 bp der 5'UTR des  
20 WIR1a-Gens ohne das Translationsinitiationskodon ATG. Das resultierende Konstrukt enthielt eine transkriptionelle Fusion des intronenthaltenden WIR1a Genfragmentes mit GUS, unter der Kontrolle des GSTA1 Promotors.

2) Herstellung der verwendeten Konstrukte

- 25 a) Expressionsvektor pPS24 (Oxalat-Oxidase-Expression unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors)

Ein *Hind*III/*Sph*I Fragment von 745 bp Länge des Weizen gf-2.8 Gens (Oxalat-Oxidase; Acc. Nr. M63223) enthaltend den gesamten offenen Leserahmen (ORF) wurde in die pflanzliche Expressionskassette pGY1 subkloniert, was im Konstrukt

- 30 pGermin (beschrieben in Schweizer et al., 1999) resultierte. Für diese Klonierung

wurde das Oxalat-Oxidase-Fragment in einen Zwischenvektor ligiert, um das Fragment mittels der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Pst*I in pGY1 ligieren zu können. Aus pGermin wurde ein *Sma*I/*Eco*RI Fragment von ca. 1 kb Länge, enthaltend das Oxalat-Oxidase-Gen und den CamV 35S Terminator, in den

5 *Sma*I/*Eco*RI-geschnittenen und über Agarose-Gelelektrophorese gereinigten pPS18 Vektor ligiert. Das resultierende Konstrukt enthielt eine transkriptionelle Fusion des intronenthaltenden WIR1a Genfragmentes mit dem Oxalat-Oxidase-Gen unter der Kontrolle des GstA1-Promotors. Gegenüber pPS18 enthielt das Konstrukt nicht mehr den GstA1 Transkriptionsterminator, sondern denjenigen des CamV 35S Gens.

10

b) Expressionsvektor pPS41 (TAPERO-Expression unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors)

Aus pWIR3 (enthaltend eine transkriptionelle Fusion zwischen dem CamV 35S Promotor und TAPERO; Schweizer et al., 1999) wurde ein TAPERO-Fragment von

15 ca. 1.2 kb Länge durch Restriktionsverdau mit *Sma*I und *Pst*I isoliert. Das TAPERO-Fragment wurde in Vektor pPS24, der mit *Sma*I und *Pst*I (partiell) verdaut und über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt wurde, ligiert. Dies resultierte in einer transkriptionellen Fusion des intronenthaltenden WIR1a-Genfragmentes mit dem

TAPERO-Gen (Acc. Nr. X56011), unter der Kontrolle des GstA1-Promotors, in dem 20 das Oxalat-Oxidase Gen durch das TAPERO-Gen ausgetauscht wurde. Wie pPS24 enthält pPS41 den Transkriptionsterminator des CamV 35S Gens.

c) Expressionsvektor pWIR5-TaMlo-RNAi (Expression des Mlo-RNAi-Konstrukts unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors)

25 Zunächst wurde das im Vektor pGEM-Teasy subklonierte 3. Intron des *Mla1* Resistenzgens aus Gerste (ca. 1.1 kb) mittels *Eco*RI und *Pst*I isoliert und in den ebenfalls *Eco*RI und *Pst*I geschnittenen Vektor pBSw41 (pBluescript-Derivat mit partieller *TaMlo1* cDNA, kloniert von Candace Elliott im Rahmen ihrer Dissertation; GenBank accession no. AF361933) ligiert. Aus diesem Konstrukt wurde das *Mla1* 30 Intron zusammen mit einem Teil der codierenden Sequenz des *TaMlo1*-Gens als ca.

1.55 kb *PstI/MscI*-Fragment isoliert (= Fragment 1). Parallel hierzu wurde per PCR aus dem Plasmid pBSw41 mit den Oligonukleotiden T3 (Standard-Sequenzier-Primer für pBluescript) und TaMlo1-1 (5' GTC GCA TGC CTG TCC ACA CGA AAT GTG C 3', *SphI* Restriktionsschnittstelle unterstrichen) ein ca. 450 bp großes

- 5 Fragment amplifiziert. Nachfolgend wurde das PCR-Fragment mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *SphI* verdaut (= Fragment 2). Der Vektor pPS24 (Promotor + Oxalat-Oxidase, siehe oben) wurde mittels Restriktionsverdau mit *SmaI* und *SphI* geöffnet und das herausgeschnittene Oxalat-Oxidase-Genfragment verworfen. In einer Drei-Komponenten-Ligation wurden sodann die oben  
10 beschriebenen Fragmente 1 und 2 in den *SmaI/SphI* geschnittenen Vektor pPS24 ligiert. Bei dieser Ligation sind die Enden der *MscI* und *SmaI* geschnittenen Komponenten kompatibel, da es sich bei beiden um sogenannte „stumpfe Enden“ (blunt ends) handelt. Das resultierende Konstrukt (pTaMlo1 RNAi) enthält ca. 300 bp des *TaMlo1*-Gens sowie ca. 150 bp Polylinker/Adaptor-Sequenz als „inverted repeats“, separiert durch das *Mla1*-Intron. Die Kontrolle dieser Transkriptionseinheit unterliegt dem *GstA1* Promotor.

Anmerkung: Das hier aus historischen Gründen als *TaMlo1* bezeichnete Gen erhielt später die Bezeichnung *TaMloA1* (Elliott *et al.*, 2002). Mol. Plant Microbe Interact. 15: 1069-1077 (2002).

20

- 3) Transformation der Weizenpflanzen  
Weizenpflanzen (cv. Bobwhite) wurden in Phytokammern für 40 Tage bei 15°C tagsüber und 12°C nachts unter Kurztagbedingungen (10h/d, ca. 600 µE) und nachfolgend im Gewächshaus bei 18/16°C und einer Photoperiode von mindestens  
25 16 h angezogen. Die Ähren wurden entweder unmittelbar verwendet oder bis zu 5 Tage bei 4°C aufbewahrt. Die von der Ähre abgenommenen Karyopsen wurden für 2 Minuten mit 70% Ethanol und dann für 15 bis 20 Minuten in 5% Natriumhypochlorit-Lösung/ 0,1% Tween 20 oberflächensterilisiert und schließlich viermal mit sterilem Aqua bidest gewaschen.

30

- 28 -

- Unreife Embryonen mit einer Größe von 0,5 bis 1,5 mm wurden unter sterilen Bedingungen aus den Karyopsen herauspräpariert und mit dem Scutellum nach oben auf Kallusinduktions-Medium in Petrischalen aufgelegt (Basismedium nach Murashige Skoog (1962) mit 2 mg/l 2,4-D, 40 g Maltose-Monohydrat, 500 mg/l L-5 Glutamin, 100 mg/l Caseinhydrolysat, 5 µM CuSO<sub>4</sub> und 0,25% Phytagel). Die Kulturen wurden bei 25°C im Dunkeln inkubiert.
- Fünf bis sieben Tage nach Isolierung der Embryonen erfolgte die biolistische Transformation. Vier bis sechs Stunden vor dem Partikelbeschuss wurden die bereits 10 proliferierenden Embryonen auf neues Medium mit verringertem Wasserpotenzial übertragen (wie oben, supplementiert mit 0,3 M Mannitol) und bei 25°C im Dunkeln inkubiert.
- Das Plasmid pAHC20 (Christensen and Quail 1996), das das Phosphinothricinacetyltransferase-codierende *bar*-Gen enthält, wurde in einem molaren Verhältnis von 1:1 mit einem zu co-transformierenden Vektor gemischt. Insgesamt wurden dann 10 µl Plasmid-DNA-Lösung auf die Partikel von 25 µl einer 60 mg/l Goldsuspension präzipitiert. Für einen Beschuss wurden 30 µg Partikel in 5 µl Ethanol auf einen Makrocarrier aufgetragen. Der Beschuss erfolgte entsprechend den Herstellerangaben der DuPont PDS-1000/He.
- Zwölf bis 16 Stunden nach dem Partikelbeschuss wurden die Explantate auf neues Kallusinduktions-Medium (wie für die Vorkultur der Embryonen) übertragen und 10 Tage bei 25°C im dunkeln inkubiert.
- Die Kalli wurden danach auf Differenzierungsmedium übertragen (Basismedium nach Murashige and Skoog (1962) mit 20 g/l Saccharose, 5 µM CuSO<sub>4</sub>, 0,25% Phytagel und 3 mg/l Bialaphos) und bei einer Photoperiode von 16h bei 200 µE und 25°C inkubiert.

- 29 -

Nach 2 Wochen erfolgte die Übertragung der nicht verbräunten Kalli auf Regenerationsmedium (Basismedium nach Murashige and Skoog (1962) mit 20 g/l Saccharose, 0,25% Phytagel und 4 mg/l Bialaphos) und eine weitere Inkubation bei einer Photoperiode von 16h bei 200 µE und 25°C.

5

Nach weiteren 2 Wochen wurden die entstandenen Sprosse vereinzelt, in Kulturröhrchen mit Regenerationsmedium übertragen und bei einer Photoperiode von 16h bei 200 µE und 25°C weiterkultiviert.

- 10 Die Identifizierung transgener Regenerate erfolgte per PAT-Aktivitätstest von Blattextrakten nach Spencer et al. (1990) bzw. durch Amplifizierung Transgen-spezifischer Sequenzen aus genomischer DNA der Kandidatenpflänzchen und/oder Southern Blot unter Verwendung einer entsprechenden Sonde.
- 15 Die Transformationseffizienz der Methode lag in Abhängigkeit von der Qualität des Ausgangsmaterials zwischen 0,5 bis 3 transgenen Pflanzen pro 100 kultivierten Embryonen.
- 20 4) *In situ* Oxalat-Oxidase-Aktivität in Pflanzen mit dem pPS24-Konstrukt Blattsegmente von Bobwhite Wildtyppflanzen oder von pPS24-transgenen Weizenpflanzen der T3 Generation wurden unter Vakuum mit Oxalat-Oxidase-Nachweislösung (2.5 mM Oxalsäure, 3.5 mM freies EDTA, 0.6 mg/ml 4-Chlor-1-Naphthol, 50 µg/ml Peroxidase aus Meerrettich, 20% v/v Ethanol, mit Tris Base auf pH 4.0 eingestellt) infiltriert und über Nacht bei +37°C inkubiert. Nach Entfernen der Nachweislösung wurden die Blätter für weitere 24 h bei +4°C in H<sub>2</sub>O inkubiert. Danach wurden die Blätter von Hand mittels Skalpell in dünne Segmente quergeschnitten und mikroskopiert. Die Phasenkontrast-Lichtmikroskopie erfolgte mit einem Zeiss Axiophot bei 100-facher Vergrößerung. Zellen mit Oxalat Oxidase Expression besitzen violett gefärbte Zellwände.
- 25

30

- 5) Nachweis des TAPERO-Transgens in pPS41-transgenen Pflanzen durch Northern-Blot-Analyse
- Blätter von Bobwhite und von pPS41-transgenen Pflanzen der T2 Generation (je ca. 1 g Frischgewicht, FG), beide im Fahnenblattstadium, wurden in flüssigen Stickstoff
- 5 homogenisiert, bis feines Pulver entstand. Das Pulver wurde zu 3 ml RNA-Extraktionsspuffer (0.5 M Tris-Cl pH 8.0; 0.25 M Na-EDTA; 5% (w/v) SDS) und 1,5 ml puffergesättigtem Phenol gegeben (15 ml Plastik-Röhrchen) und gut geschüttelt.
- Die Extrakte wurden für 30 min bei 4000 rpm-5000 rpm, 20°C zentifugiert (swing out, Heraeus Varifuge). Es wurde 1,5 ml Chloroform zugegeben (ohne Überstand abzugießen) und das Röhrchen mehrere Male invertiert. Die Extrakte wurden für 30 min bei 4000 rpm-5000 rpm, 20°C rezentifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Röhrchen (15 ml Plastik-Röhrchen) gegossen. Die RNA wurde durch Zugabe von 3 ml 6 M LiCl gefällt (über Nacht, 4°C). Die gefallte RNA wurde für 30 min bei 12500 rpm, 4°C zentifugiert (Festrotor, Hermle Z360K), die RNA-Pellets wurden in
- 10 500-1000 µl 70% Ethanol aufgenommen (RNA löst sich nicht) und in Eppendorf röhrchen überführt. Die Proben wurden für 10 min bei 14000 rpm, 4°C zentrifugiert (Festrotor, Eppendorf Centrifuge 5417R) und der Überstand abgehoben. Die RNA-Pellets wurden 5 min bei 37°C getrocknet, in 100 µl-200 µl TE aufgenommen und 5-10 min bei 75°C gelöst. Die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese der RNA in
- 15 formaldehydhaltigen Gelen und der Transfer auf Nylonmembranen (Hybond N, Amersham) erfolgte gemäss Standardprotokollen (Sambrook et al., vide supra). Pro Probe würden 10 µg RNA aufgetragen.
- Die radioaktive Sondenmarkierung mit  $\alpha$   $^{32}$ P-dCTP erfolgte nach der Methode des „random prime labelling“ unter Verwendung eines Kits (Roche). Die Hybridisierung
- 20 erfolgte über Nacht bei 65°C in CHURCH Puffer (0,5 M NaPhosphat pH 7,2; 1 % (w/v) BSA; 7 % (w/v) SDS; 1 mM Na<sub>2</sub>ETDA). Die Blots wurden 2 x 15 min in Waschlösung (0.1 x SSC; 0.1 5 w/v) SDS) bei 65°C gewaschen und anschließend für 16-48 h gegen Phosphorimager-Screens exponiert. Die exponierten Screens wurden mit einem Phosphorimagergerät (FujiFilm FLA 3000) eingescannt und als
- 25 30 Bilddateien im TIFF Format exportiert.

6) Nachweis des TAPERO-Transgens in pPS41-transgenen Pflanzen durch Western-Blot-Analyse

Blattspitzen von Bobwhite und von pPS41-transgenen Pflanzen der T2 Generation,

5 beide im Fahnenblattstadium, wurden in IWF Puffer (32 mM Na-Phosphat; 84 mM Citrat; pH 2.8; Spatelspitze Polyvinylpolypyrrolidon) homogenisiert. Die Homogenate wurden für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden mit 0.5 g/ml Ammoniumacetat versetzt und säurelösliche Proteine über Nacht bei 4°C gefällt. Die Proteine wurden für

10 30 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Proteinpellets wurden in 50 µl/g FG Resuspensionspuffer (50 mM Tris-Cl pH 7.5; 20 % (v/v) Glycerin) aufgenommen. Zu 20 µl Probe wurden 5 µl 4-fach konzentrierter SDS Probenpuffer zugegeben, und die Proben wurden mit soviel (1-5 µl) gesättigter Tris-Lösung versetzt, bis der Farbumschlag des Bromphenolblaus zu Blau stattfand. Pro Spur

15 wurden 12,5 µl gekochte Probe in denaturierender SDS-

Polyacrylamidgelektrophorese (15%iges Trenngel) nach einer Standardmethode unter Verwendung von Minigelapparaturen der Firma Bio-Rad aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder Coomassie gefärbt (als Beladungskontrolle) oder nach einer Standardmethode auf eine

20 Nitrozellulosemembran übertragen (geblottet). Die Membranen wurden nach einer Standardmethode mit einem ersten, polyklonalen Antikörper (Verdünnung 1:2000), gerichtet gegen das Prx8 Protein aus Gerste (ein homologes Protein zu TAPERO), inkubiert, gefolgt vom zweiten Antikörper (Verdünnung 1:2000), der gegen Kaninchen-Antikörper gerichtet und an den alkalische Phosphatase gekoppelt war.

25 Die TAPERO Proteinbanden wurden durch lokalisierte alkalische Phosphataseaktivität (BCIP/NBT Färbelösungen; Fertigtabletten (Roche)) nachgewiesen.

7) Nachweis der epidermisspezifischen Transgenexpression durch Northern-Blot-

30 Analyse und Real-Time-PCR-Analyse

Die RNA-Extraktion und die Northern-Blot-Analyse wurden durchgeführt wie in Beispiel 5 beschrieben. Die Real-Time-PCR-Analyse erfolgte mit einem LightCycler®-Gerät (Roche, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben.

5

8) Mehltäuresistenz in pPS41- bzw. pWIR5-TaMlo-RNAi-transgenen Pflanzen  
Für den Resistenztest wurden adulte, im Gewächshaus angezogene pPS41- oder pWIR5-TaMlo-RNAi-transgene Weizenpflanzen mit voll entwickeltem, frisch geschobenem Fahnenblatt verwendet. Als Kontrollen dienten gleichzeitig

10 angezogene Wildtyp-Pflanzen

cv. Bobwhite. Die apikale Hälfte des Fahnenblattes wurde abgeschnitten und auf 0,5% (w/v) Phytoagar, der mit 20 ppm Benzimidazol versetzt war, in 20 x 20 cm großen Polycarbonat-Schalen aufgelegt. Pro Schale wurde eine transgene Sublinie (je 20 Blätter) plus Bobwhite Wildtyp (je 6 Blätter) aufgelegt. Die Blattsegmente

15 wurden in einem Inokulationsturm mit Mehltausporen inokuliert, indem Sporen von 4 stark inokulierten Weizenblättern in den Turm eingeblasen wurden. Nach 5 min wurden die Schalen entfernt, geschlossen und bei 20°C und indirektem Tageslicht inkubiert. Sieben Tage nach Inokulation wurde der Mehltaubefall bonitiert unter Verwendung eines Klassenbonitursystems (Schweizer et al., 1995). Die Resistenz  
20 wurde bezogen auf die sich auf der jeweiligen Phytoagarplatte befindlichen Kontrollblätter berechnet.

**Literatur:**

- Christensen and Quail (1996) Transgenic Res. 5: 213-218.
- 5 Elliott *et al.*, (2002). Molecular Plant Microbe Interactions 15: 1069-1077.
- Murashige and Skoog (1962) Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- 10 Schweizer, P., Vallérian-Bindschedler, L., and Mössinger, E. (1995). Heat-induced resistance in barley to the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*, Physiological and Molecular Plant Pathology 47, 51-66.
- Schweizer, P., Pokorny, J., Abderhalden, O., and Dudler, R. (1999). A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat, Mol Plant-Microbe Interact 12, 647-654.
- 15 Spencer et al. (1990) TAG 79: 625-631.

## A N S P R Ü C H E

1. Promotorregion mit Spezifität für die pflanzliche Epidermis,  
5 umfassend eine erste, aus dem Promotor des Gens GSTA1 stammende Sequenz, und  
eine zweite, aus dem Intron des Gens WIR1a stammende Sequenz.
  
2. Promotorregion nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ersten Sequenz um SEQ ID Nr. 1 und  
10 bei der zweiten Sequenz um SEQ ID Nr. 2 handelt.
  
3. Promotorregion nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet, dass sie ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus
  - a) Promotorregionen, die die unter SEQ ID Nr. 3 angegebene  
15 Nukleinsäuresequenz umfassen,
  - b) Promotorregionen, die einen funktionalen Teil der unter SEQ ID Nr. 3  
angegebenen Nukleinsäuresequenz umfassen, und
  - c) Promotorregionen, die eine Sequenz aufweisen, die unter stringenten  
Bedingungen mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen  
20 Nukleinsäuresequenz hybridisiert.
  
4. Chimäres Gen,  
dadurch gekennzeichnet, dass es eine Promotorregion nach einem der Ansprüche 1  
bis 3 in operativer Verknüpfung mit einer kodierenden Sequenz enthält.  
25
  
5. Chimäres Gen nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet, dass seine Expression zu einem erhöhten Gehalt des von  
der kodierenden Sequenz kodierten Proteins in der Epidermis führt.

6. Chimäres Gen nach Anspruch 4 oder 5,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass die kodierende Sequenz aus einem Resistenzgen  
stammt.

5 7. Chimäres Gen oder rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach  
Anspruch 5 oder 6,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass die kodierende Sequenz für eine Peroxidase oder  
eine Oxalat-Oxidase kodiert.

10. 8. Chimäres Gen nach Anspruch 4,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass seine Expression die Expression des entsprechenden  
endogenen Gens in der Epidermis unterdrückt.

15 9. Chimäres Gen nach Anspruch 8,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass die kodierende Sequenz in antisense-Orientierung  
vorliegt.

20 10. Chimäres Gen nach Anspruch 8,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass die Unterdrückung der Expression des endogenen  
Gens durch RNA-Interferenz erfolgt.

11. Chimäres Gen nach einem der Ansprüche 8 bis 10,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass das endogene Gen, dessen Expression unterdrückt  
wird, das Mlo-Gen ist.

25 12. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül, umfassend eine  
Promotorregion nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder ein chimäres Gen nach  
einem der Ansprüche 4 bis 11.

- 36 -

13. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 12, zusätzlich umfassend transkriptionelle Terminationssequenzen.

14. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen mit  
5 epidermisspezifischer Expression eines Transgens, umfassend die Schritte:  
a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch  
12 oder 13,  
b) Übertragung des rekombinanten Nukleinsäuremoleküls aus a) auf  
pflanzliche Zellen und  
10 c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht,  
Vermehrung der Pflanzen

15. Transgene Pflanzen, enthaltend ein rekombinantes  
Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 12 oder 13 oder hergestellt nach einem  
15 Verfahren nach Anspruch 14, sowie transgene Teile dieser Pflanzen und deren  
transgenes Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen,  
Knollen oder Stecklinge, sowie die transgenen Nachkommen dieser Pflanze.

16. Transgene Pflanzen nach Anspruch 15, bei denen es sich um  
20 monokotyledone Pflanzen handelt.

17. Transgene Pflanzen nach Anspruch 16, bei denen es sich um Poaceen  
handelt.

- 25 18. Transgene Pflanzen nach Anspruch 17, bei denen es sich um Weizen  
oder Gerste handelt.

19. Verwendung einer Promotorregion nach einem der Ansprüche 1 bis 3  
zur epidermisspezifischen Expression von Transgenen in Pflanzen.

20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei das Transgen ein Resistenzgen ist.

21. Verfahren zur Erhöhung der Pathogenresistenz in transgenen  
5 Pflanzen, umfassend die Schritte:

- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch  
12 oder 13,
- b) Übertragung des rekombinanten Nukleinsäuremoleküls aus a) auf  
pflanzliche Zellen und
- 10 c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht,  
Vermehrung der Pflanzen.

22. Transgene Pflanzen mit erhöhter Pathogenresistenz, enthaltend ein  
rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 12 bis 13 oder  
15 hergestellt nach einem Verfahren nach Anspruch 21, sowie transgene Teile dieser  
Pflanzen und deren transgenes Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten,  
Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, sowie die transgenen  
Nachkommen dieser Pflanze.

20 23. Transgene Pflanzen nach Anspruch 22, bei denen es sich um  
monokotyedone Pflanzen handelt.

24. Transgene Pflanzen nach Anspruch 23, bei denen es sich um Poaceen  
handelt.

25 25. Transgene Pflanzen nach Anspruch 24, bei denen es sich um Weizen  
oder Gerste handelt.

26. Transgene Pflanzen nach einem der Ansprüche 22 bis 25,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass sie eine erhöhte Resistenz gegen Echten Mehltau  
zeigen.

**Abbildung 1:****GstA1 Promotor**

GACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCCCAGGTCCCAAGGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCAGGGTGAC  
TGGATGACGAGCAGCACCTGGCTGGCGGTTGGCGAGTAGAACCAAGGGCGATGGCGACGCCGCTGACCTCTCCCC  
TCACCGCGATCTGCTCCTCTGGGGGGCTGCCGGCTGACGTTCTGTCGGGGGGGGCTGCCGGCTGGCGTTCT  
GCTGCGGGGGTGGGAGTCGGCAGCGGTGCTGCTAGGACAATGGTGGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTG  
GCGAAGAGATCCGAGTCCTGGGAGATCAGTGAGGCCAGGTGCTATTGGCCTATCAATTGGCCAGGTTCTGGAACGGG  
GCGTGGCGTGTACACGAGGTGCTAGGCTGCTAGCTAGGAACTGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGC  
TAAGTACTTTAACCTTCCCTTACATCCACCTGATTAGATTGATCTAAATTAAACTTGCAAAAAATATATGTG  
TGATATCCATCTACTATAATTGCTTACAATCAAATTATATGTGATTTTTAGTTAGAAGATTATATGCAACAGTAA  
ATCTGAATGTTCTCACATGCATGATTAGTTAACCTTAAAGAGTTACTAAACTAGTCTTGATAAAAGAGATCTTTGG  
AGCAACACCAACCTCGTGAAGGTGTTTGCCTACGGAAAGGTGCTATGTAATGATTATTAGGATCAAAGTTGTA  
GGATAAACGTAACCTCTCGATGTCATTTATACAACATGTAGTTAGTTAGTTATGGAGAGAGTGAATTAAACACT  
TTGTGTTAACGAGTAGAAGTAAGTTATTCCACACTCTAGGCAAACGAACTATTGGCAAAATATCTCGCTAGCTGGTGGAG  
CCAGAGCCGTGAAAGTCGTCTGCTATTAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTAGGCCATGGAAAAGTGATGTG  
TCGCCCTACCAATGGGCAACTGCTAGCGATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTATAGAACATGCAAGGGCTTGGC  
AAGTGGAAAATGATTGATCGCTGGCAAGCTTAACCTCGGAACCTATGCAACTGAACTCAGAACAAAGATTAAAA  
AAAAATACATTCCATCGATAGTGAACAAATTATTCATTGAGTGACAACGAAATCATATTGGAATGTACATTACTTGT  
TGATTTAAATTAGAGGCATTTCACCTTTAGTTAATAAGATATGCAATACCCACCCTTAGTGTGTTTCAGACA  
ACGAGAGGGCACATTGCTTTGGTGCTACCCTCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTCGGGACACGATTATCTCCCGCG  
TTGGAATATCGTGGCTGGTAGAGCTAGCGAAAATCTTCCATGTTGGAAATATGTCGGCAGCCGATAGCCGCATGCAT  
GTAAAGTCTCTTACCTTACCTGCTCAAGTGACACTGTATGTCGCCCTACACTTGCTAAATCAATGGGCAACTG  
TAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTACAGTGTGTTGCTACAGTTCTGACTTTGTTCTCATTAGACTAGCTG  
ACTACTGTCGCTTACCTGCCCTCCCTCTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAG  
GGCGCGATCGATGTTGGAGTAATTGAAATTCTAAATCTATCTGTTGTTGTTCTCCATTCGGTACCGATGTTGGGGGGC  
TGTCGGAATTTGGTCCCGGATCTACAAAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTCTCCATTCGGTACCGACGTGTT  
CTAACTAGTACTTACTTCCCTCGCACCCAAATAGGAATAGAGGGAGTAGTCATAAAACTAACAAAGATGATTACTTACCC  
GGTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTAATTGGCACTCATTTCAATATCTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAG  
ATCTAGACACTAGCTAAAAGTCGATGTTAGCCTGGTATTCCTGGCCACGCCGGGGGTGTTGCTCCCTGCTCT  
GTGTATAAAATGGAGATCAACATCCAAGGCCTCCCTCCCA

**Abbildung 2:****WIR1A Intron:**

GTCAGTCGCGGACGGTGTCCGTTCATTTCTCCCCATTTTGTAATTGATTAACTTGTTATACATGCTGACCTCGACCTGCT  
GAATAACGTCCGTCCATGGTTCCCGTCCAGGCACC

**Abbildung 3:****GstA1 Promotor mit WIR1a Exon/Intron:**

GACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCCCAGGTCCAAGCCCTCGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGCGAGGTGAC  
TGGATGACGAGCACCCCTGGCTGGCGAGTAGAACCGGGCGATGCCGACGCCGTGACCTCTCCCC  
TCACCGGCAGATCTGCTCCTCTGGGGGGCTGCCGGCTGACGTTCTGCGGGGGTGGGGCTGCCGGCTGGCGTTCT  
GCTGGGGGTGGGGAGATCGTAGGACAATCGGTGAGGCCAGGTCTATTGGCCTATCAATTGGCAGGTTCTGGGAACCGGG  
GCGAAGAGATCCGAGTCCTGGGAGATCAGTGAGGCCAGGTCTATTGGCCTATCAATTGGCAGGTTCTGGGAACCGGG  
GCGTGGCGTGTCAACGAGGTGCTAGGCTGCTAGCTAGGGAACTGGATCTGGAACGTTGAGGCCAGGTCTGGTATGC  
TAAGTACTTTAACCTTCCTTCACATCCACCTGATTCAAGATTATTTGATCTAAATTAACTTGCAAAAAATATATGTG  
TGATATCCATCTACTATAATTGCTTACAATCAAATTATATGTGATTTTTAGTTAGAAGATTATATGACAGTAA  
ATCTGAATGTTCTTCACATGCATGATTAGTTAACCTTAAGAGTTACTAACTAGTCTGATAAAGAGATCTTTGG  
AGCAACACCAAAACCTCGTGGGTGTTGCCTACGGAAAGGGTGTCTATGTAATGATTATTAGGATCAAAGTTGTA  
GGATAAACGTAACACCTCTCGATGATCTTTATACAACATTGAGTTAGTTATGATGTTAGGAGAGTGATTAACACT  
TTGTGTTAACGAGTAGAATAAGTTATCCACACTCTAGCCAAACGAACTATTGGCAAAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAG  
CCAGAGCCGTGAAAGTCTGCTTGCATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTAGGCCATGGAAAAGTGTG  
TCGCCTACCAATGGGCAACTGCTAGCGATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTATAGAACATGCAAGGCCTGGC  
AAGTGGAAAATGATTGATCGCTGGCAAGCTTAACCTCGGAACCTATAGCATTCAACTGTAATCAGAACAAAGATTAAAA  
AAAAATACATTCCATCGATAGTGAACAAATTATTCACATTGAGTGACAACGAAAATCATATTGGAAATGTACATTACTG  
TGATTTAACATTAGAGGCATTTCACCTTTAGTTAATAAGATATGCAATACCCACCTTGTGTTTCGAGACA  
ACGAGAGGGCACATTGCTTGGTGCATCTCAAGCCTCAAATAAGTTGCGGGACACGATTATCTCCCGCG  
TTGGAATATCGGCCCTGGTAGAGCTAGCAGGAAATCTTCCATGTTGGAATATGTCGGCAGCCGATAGCCGCATGCAT  
GTAAGTCTTTACCTTACCTGCTCAAGTGACACTGTATGTCGCTTACACTGCTAAATCAATGGGCAACTGC  
TAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATTTACAGTGTTTGCACAGTTCTGACTTTGTTCTCATTTAGACTAGCTG  
ACTACTGTCGCTTACCTGCCTCCCTCTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAG  
GGCGCAGTCATGTTGGAGTAATTCAAATCTATCTATCTGGGTATATTGGCCTTCACCGATGTTGGGGGG  
TGTCGGAAATTGGTTCCGCGATCTACAAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTCTCAATCCGTACCAACGCACTGTT  
CTAAGTACTTACTCCCTCGCACCAAAATGGAATAGAGGGAGTAGTCAAGTAAACTAACAAAGATGATTACTTACCC  
GGTTAACATGATTCAAGAGCTCATTAATTGGCACTCATCATTCTATATCTTTGGTAGAAATGAAATAAACAG  
ATCTAGACACTAGCTAAAGTCGATGTTAGGCTTGTGTTATTTCTGGCCACGCGGGGGGGTGGGTGCTCCCTGCTCT  
GTGATAAAATGGAGATCAACATCGAACAGGCTCCTCCCACACACAGCTACAGAGCAGAGCAGAGTCTTGCCTCCAGTAT  
CTGCCCTCTCTGCTGCCTGAGGACATCCATACGTGAAGTTACCGAACAAACTACGTACACAGGCAGCTAGCTCTCG  
AAACCTCGCTCGAAACGCACTGCAGATCGTCTTCGTCGTCGCGCGATCATCAACAGCTCCGCTGCCTT  
GGAGCCACGGCGTCCACGACGCCGCCCTCAGGTAGTCGTCGGACGGTGTCCGTTCATTTCTCCCCATTGGTAA  
TTGATTAACCTGTTATACATGCTGACCTCGACCTGCTGAATAACGTCGCCATGGTTTCCCGTCCAGGCACC

**Abbildung 4:**

TAPERO cDNA:

ACCAACCACACCCTCCACCAAGTAAGAAGTGCAGCAGGTAGCTAGTAAGCCGGCGTAGCTTGCTCTGCAGCTAGCTAGC  
TAACCATGGCCGCCCTCGCCTCTGCCCTTCCTCTTGTGGCTCGTGGCTCTGCCACGGCGCGTGGCGAGCTGTCA  
CCGACCTTCTACGACACGTCCTGCCCAAGGGCCCTGGCATCATCAAGAGTGGCGTCATGGCCGCCGTGAGCAGCGACCC  
TCGGATGGCGCGTCGCTGCTCCGGCTGACTTCCACGACTGCTTCGTCCAAGGCTCGACGCGTCGTGTTTGCTGTCTG  
GCATGGAACAAAATGCTATCCGAACGCCGGTGGCTGAGGGCTTCGGCGTCATCGACAGCATCAAGACGCAGATCGAG  
GCCATCTGCAATCAGACCGTCTCCTGCCGACATCTCACCGTCCGGCCGTGACTCCGTTGTAAGCCCTCGGAGGGCC  
GTCATGGACAGTCCCTCTGGGAGAAGAGATTCCACAGATGCAACAGAGGGCGGAAACAGCGACCTGCCAGGCTTTA  
CATCTAGCCGGTCAGATCTGAGCTGGCATTCAAGAACAAAGGGCCTCCTTAAGGATCGACATGGTGGCCCTCTCGGGCGCG  
CACACCATCGGCCAGGGCAGTGTGGGACCTTAAGGACAGGATCTACAATGAGACTAACATCGACACGCCCTTCGCCCAC  
ATCTCCGGGCCAACTGCCCAAGGTCAAACCGGGCACGGGAGCCTGGGAACCTGGACACGACAGGGCAACACGTTCG  
ATAACGCCCTACTACACCAACCTCATGTCACAGAAGGGCTCCTGCACTCGGACCCAGGTGCTGTTCAACAACGACACC  
GACAACACTGTCCGGAACTTGCCTGCAACCCAGGGCGTTCAAGCAGGCCATGATCAAGATGGCAA  
CATCGCGCCGAAGACAGGCACGCAGGGCAGATCAGGCTCAGCTGCTCCAGGGTGAACCTCGTGAATTGATAGACCGAGTTAC  
TGCAACTAGCCAGCACGACACGTACGTGAATGAATAAGGCCACAGAACCAAGTGGCCAATATAAAATACAGCTCTGAAA  
CCGTGTATTTATGTACGAGTAGCAGCAAATCATGCATCTACACATATATGTAACGATGAACTCCACTTTCT  
CATGCAAAGGCATGGAGAATTACTATCAATCTTAGTTACGTGTA

## Abbildung 5a:

## Eigenschaften von pPS41:

Gesamtlänge: 7011 bp  
 vector Backbone: pBluescript SK+, ganzes Konstrukt zwischen XhoI und SacI  
 Schnittstellen.

GstA1 Promoter:	694-2891
Transcription start:	2892
GstA1 5' UTR	2892-2988
WIR1 5' UTR (part)	2989-3034
WIR1 part of 5' CDS + Intron	3035-3246
TAPERO cDNA	3264-4509
ATG TAPERO	3348
Stop codon:	4284
Poly(A)	4510-4514
CamV 35S Terminator:	4576-4776

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTGTTAAAATCCGCTTAAATTGGTTAAATCAGCTCATTTTAACCAATAGGCCG  
 AAATCCGCAAACATCCCTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTCAGTTGGAAACAAGAGTCCA  
 CTATAAACGAGCTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCCTACAGTGAAACCAC  
 CTAATCAAGTTTTGGGCTGAGGTGGCTTAAGCACTAAATCGGAACCTTAAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTTGAC  
 GGGGAAAGCCGGCGAACGGCGAGAAAGGAAGGGAAAGCGAAAGGGAGCGGGCGTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG  
 GTCACTGCGCTAACACCCACACCCCGCGCTTAATGCCTGCGCTACAGGGCGCTCCATTGCCATTAGGCTGCG  
 CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTCGCTATTACGCCAGCTGGCAGGGGGATGTGCTGCAAGGGCGAT  
 TAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTCCCAGTCACGACGTTGAAAAGACGCCAGTGAGCGCGCTAACGACTCACTA  
 TAGGGCGAATTGGTACCGGCCCCCCTCGAGTCTAGAACTAGTGGATCCCGACGCCAGTGGAGCCGACAGCCCCC  
 AGGTCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGCGAGGTGACTGGATGACGAGCACCTGGCTGGC  
 GGGTGTGGGCGAGTAGAACCAGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTCTCCCTCACCGCGATGCTCCTGGGTG  
 GGGTCGCCGGCTGACGTTCTGCTGGGGGTGGGGCTGCCGCTGGCGTCTGCTGGGGTGGAGTCGCCGACCGGC  
 GTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGGCAGTTAGGTGCTAGGGCGATGCTGGGAGATCCGAGTCTGGGAGAT  
 CAGTGAGGCCAGGTGCTATTGGCTATCAATTGCCAGGTTCTGGAAACGGGGCTGGGTGATCAACGAGGTGCTAGG  
 CTGCTAGCTAGGAAACTGGATCTGGAAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGCTAAGTACTTTAACCTTCTTACA  
 TCCACCTGATTAGATTGATCTAAATTGAACTTGCAAAATAATATGTTGATATCCATCTACTATAATTGCTTAC  
 AATCAAAATTATATGTTGATTTTTAGTTAGAAGATTATGCACTGAAATCTGAATGTTCTCACATGCATGATT  
 TAGTTAACCTTAAAGAGTTACTAACTAGTCTGATAAAGAGATCTTGGAGCAACACCAACCTCGTGAGGTGTT  
 TGCTACGGAAAGGGTGTGCTATGTAATGATTATTAGGATCAAAGTTGAGGATAACGTTAACACTTGTGTTAAC  
 TCTTTATACAACATTGTTAGTTAGTTATATGAGAGAGTGATTTAACACTTGTGTTAACAGTGAATAAGTT  
 CCACACTGACCAAACGAACTATTGCCAAATATCTCGCTAGCTGGTGGAGAGGCCAGAGCCGTGAAAGTCTGCTTGC  
 ATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTAGGCCATGGAAAAGATGATGTTGCTGGCCATACCAATGGCCA  
 GATGTAATAATGACATCCAAGTGGATTTTATAGAACATGCAAGGCCGTTGGCAAGTGGAAAATGATTGATCGT  
 AGCTTAAACTCTCGGAACTTATAGCATTCAACTGAATCAGAACAAAGATTAAAAAAATACATTTCATCGATAGT  
 AATTATTCAATTGAGTGAACAGAACATATTGGAAATGTCATTTACTGTTGATTTAACATTAGAGGCATTTC  
 CCTTTTGTAAATAAGATATGCAATACCCACCTTAGTGTGTTCGAGACAACGAGAGGGCACATTGCTTTGGT  
 ACCATCTCTCAAGCTCAAATAAGTGTGCCGACCGATTATCTCCCGCTGGAAATATGTCGCTGGTAGAGCTA  
 GCGAAAAATCTCCATGTTGAATATGTCGGCAGCCGGATAGCCGCATGCATGTTAAAGTCTCTTACCTTACATTG  
 CTCAACTGACACTGTATGTCGCCACCACATTGCTAAATCAATGGCCAAGTGCAGTAATAGTAGCAAGTTGATT  
 TACAGTGTGTTGCTACAGTCTCTGACTTTGTTCTCATTTAGACTAGCTGACTACTGTGCTTACCTGCCTCC  
 CTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAGGGCGCATCGATGTTGAGTA  
 TTTCAAATCTATCTATCTGGGTATATTGGTCTCTACCGATGTTGGGGGGCTGCGAAATGGTCTCCCGGATCTACA  
 AAAGTAATGGAGGGAGTAGTTGTTCTCAATCGTAAACGACGTTCTGCTGAGTACTACCTTACCTTCG  
 ACAATATGGAAATAGAGGGAGTAGTCAAGAACACTAACAAAGATGATTACTAACCGGTTAACATGTTAAC  
 ATTGGCAACTCATTTCAATATCTTGTGAGAAATGAAATAAGCAGATCTAGACACTAGCTAAAGTCGATG  
 TAGCCTGTTATTCTGGCCACGGGGCGGGTGTGGTCTCCCTGCTGTGTTAAATGGAGATCAACATCCAAG  
 GCCTCTCCACACACACGCTACAGAGCAGAGCAGAGTCTGCTCCAGTATCTGCCCTCTCTGCCCTGCTGAG  
 ATCCATCAGTGAAGTTCACGGACAAACTACGTACACAGGCAGCTAGCTCTCGAAACCTCGCTGAAACGCAC  
 TCGCTCTCTCGCTCGCCGATCATCATCACAGCTCCGCTGCCCTGGAGCACGGCGTCCACGACGCC  
 GCCTCAGGTCAGTCGCGACGGTGTCCGTTCAATTCCCTCCCCATTGGTAAATTGATTAACCTGTTACATG  
 TCGACCTGCTGAATAACGCTCCGTCATGGTTCCCTGAGGCTCCAGGCCACCCGGCTGCAGGAATT  
 CCAGTAAGAAGTGCAGCAGGTAGCTAGTAAGCCGGCTAGCTTGTCTGCTGAGCTAGCTAGCTA  
 GCCTCTGCCTTCTCTGTGGTCTGCTGGCTCTGGCACGGCGCGTGGCGAGCTGTCACCGAACCT  
 GTCCTGCCCAAGGGCCCTGCCATCATCAAGAGTGGCGCATGGCCGCGTGGCGAGCTGTCACCGAAC  
 TGCTCCGGCTGCACTTACGACTGCTCGTCAAGGCTGCGACGGCTGCTGCTGAGGCTGCTGG  
 ATCCCGAACGGGGGCTGCTGAGGGGCTCGGCTCATGACAGCATCAAGACGCA  
 CGTCTCTGCGCCGACATCTCACCGTCCGCGCTGACTCCGTTGAGCCCTGGAGGGCGCT  
 TGGGGAGAAGAGATTCCACAGATGCAAACGAGGCCGGCAAACAGCGAC  
 CTCAGTGTGGCATTGAGAACAGGGCCTCTGAGTCAACATGGTGG  
 GCAGTGTGGACCTTAAGGACAGGATCTACATGAGACTAACATCG  
 ACACGGCCTCGCCACATCTCCGGGCAACT

GCCCCAGGTCAAACGGCGACGGGAGCCTGGCGAACCTGGACACGACGGCCAACACGTTCGATAACGCCACTACACC  
 AACCTCATGTCACAGAAGGGGCTCTGCACCTGGACCCAGGTGCTTCAACAACGACACCACCGACAACACTGTCCGGAA  
 CTTTGCCTGAAACCCAGCGCGTTCAGCAGCGCCTTCAGCACGCCATGATCAAGATGGCAACATCGCGCCGAAGACAG  
 GCACGCAGGGCAGATCAGGCTCAGCTGCTCCAGGGTGAACCTGTGATTGATAGACGAGTTACTGCATACTAGCCAGCAC  
 GACACGTACGTGAATGAATAAGGCCACAGAACCCAGTGGCCAATATAAAATACAGCTTGAAACCGTGTATTTATGTAC  
 GAGTAGCAGCAAATCATGCATCATCACATATATGTAACGATCGAATTCCCACCTTCTCATGCAAAGGCATGGAG  
 AATTACTATCAATCTTAGTATACTGTGATAAAAAGCGGCCGCAATTGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCG  
 ACCTGCAGGCATGCCCTGAAATCACCAAGTCTCTACAAATCTATCTCTCTATAAATATGTTGAGTAGTCTCCC  
 AGATAAGGGAAATTAGGGTTCTTATAGGGTTCGCTATGTGTTGAGCATATAAGAAACCTTAGTATGTATTTGTATTTG  
 TAAAATACTTCTATCAATAAAATTCATACTTCTAAAACAAATCCAGGGTACCGAGGCTCGAATTCTAGTCTACGCCG  
 CCGCGAGCTCCAGCTTTGTCCTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCCCTGTG  
 TGAAATTGTTATCCGCTACAATTCCACACAACATACGAGGCCAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGTGCTTAATGAGT  
 GAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGCTGCGCCAGCTGCTTAATGAA  
 TCGGCCAACGCGGGAGGGAGGGCTTGGCTATTGGGCGCTTCCGCTCTCGCTACTGACTCGCTGCCGCTGGTC  
 GTTCCGCTGCGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCCGTAATACGGTTATCCACAGAAATCAGGGATAACGCCAGGAAA  
 GAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAGAAAAGCCAGGAAACGTAAGGCGCGTTGCTGGCGTTTCCATAGGCCTCCGCC  
 CCCCTGAGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAAGGCCTT  
 CCCCTGGAAGCTCCCTGCGCTCTCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCGCCCTTCTCCCTCGGG  
 AAGCGTGGCCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTCGGTGTAGGTGCTTCAGCTCCAGTGGCTGTG  
 TCGCCACTGGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTGAAAGTGGTG  
 GCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG  
 GTAGCTTGTATCCGGCAAACAAACCGCTGGTAGCGGTGTTTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCCAGAAAA  
 AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTGATCTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACTCACGTTAAGGGATTT  
 GGTGATGAGATTATCAAAAGGATCTCACCTAGATCCTTTAAATTAAATGAAAGTTAAATCAATCTAAAGTATAT  
 ATGAGTAAACTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGCTTATTCGTTCATCC  
 ATAGTTGCTGACTCCCCGCTGCTGTAGATAACTACGATACGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACC  
 GCGAGACCCACGCTACCGCTCAGATTATCAGCAATAAACAGCCAGCGGAAGGGCGAGCGCAGAAGTGGTCTG  
 CAACCTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTCGGGAAAGCTAGAGTAAGTAGTCGCCAGTTAATAGTTGCGC  
 AACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGGTATGGCTTCACTCAGCTCCGGTTCCCAACG  
 ATCAAGCGAGTTACATGATCCCCCATGGTGTGAAAAAGCGGTTAGCTCTCGTCTCGATCGTTGTCAGAAGTA  
 AGTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCGTAAGATGCTTT  
 TCTGTGACTGGTAGTACTCAACCAAGTCATTGAGAATAGTGTATGCGCGACCGAGTTGCTCTGGGGCGAAACTCTCAA  
 ACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACCTTAAAGTGTCTCATTTGAAAACGTTCTCGGGGGCGAAACTCTCAA  
 GGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTGATGTAACCCACTCGCACCCAACTGATCTCAGCATCTTTACTTCA  
 AGCGTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCGCAAAAAGGGATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACT  
 CATACTCTCCTTTCAATATTATGAAAGCATTATCAGGGTATTGTCATGAGCGGATACATATTGAAATGTATTT  
 AGAAAATAACAAATAGGGTTCCGCGCACATTCCCCGAAAAGTGCCAC

Fortsetzung Abbildung 5a

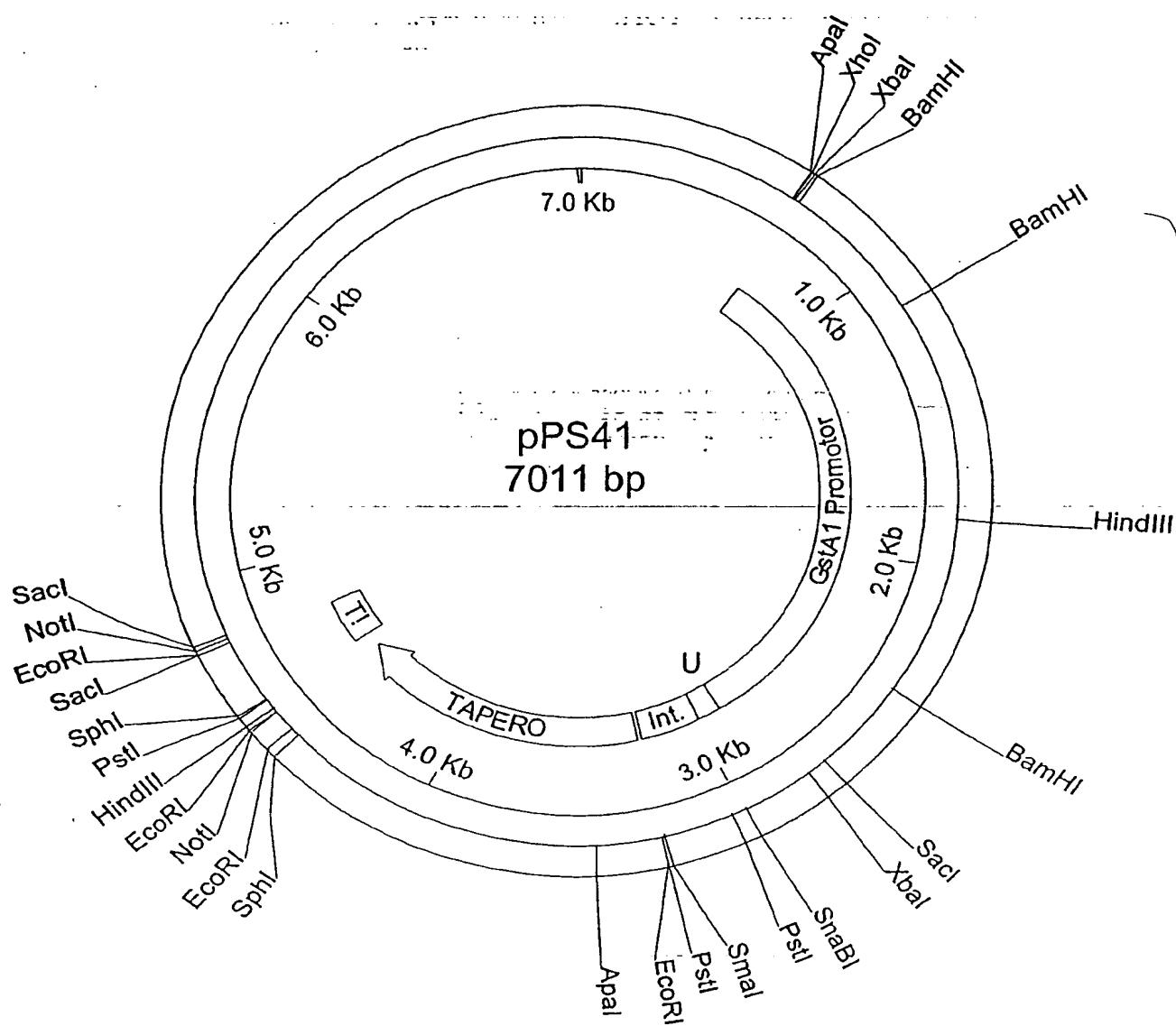


Abbildung 5b

**Abbildung 6:**

Germin 9f-2.8:

AGCTTATTACATAGCAAGCATGGGGTACTCCAAAACCCTAGTAGCTGGCTGTCGAATGCTGTACTAGCTCCGGCG  
TCTTGCCACCGACCCAGACCCCTCTCAGGACTTCTGTGTCGGCACCTCGACGCCAAGGCCTCGGTGAACGGGCAC  
ACGTGCAAGCCCAGTCGGAGGCCGAGCAGACTCCCTTCTCGTCAAGTTGGCCAAGGCCGCAACACGTCACCCCC  
GAACGGCTCCGGTGAAGGGAGCTCGACGTGGCCAGTGGCCCGTACCAACACGCTGGGTGTGTCCATGAACCGCGTGG  
ACTTTGCTCCGGAGGCACCAACCCACACATCCACCCCGGTGCCCACCGAGATCGGCATCGTATGAAAGGTGAGCTT  
CTCGTGGGAATCTTGGCAGCCTCGACTCCGGAACAGCTACTCGAGGGTGGTGGCGCCGGAGAGACGTCCTCAT  
CCACGGGCCATGCACCTCCAGTCAACGTCGGTAAGACCGAGGCCCATGGTCGTCTCCTCAACAGCCAGAAC  
CCGGCATTGTCTTGTGCCCCCTACGCTTCTCGGCTCCAACCCGCCATCCCAACGCCGGTGTCAACCAAGGCACCTCCGG  
GTGGAGGCCAGGGTGTGGAACTTCTCAAGTCCAAGTTGCCGCTGGGTTTAATTCTAGGAGCCTTCCCTGAAATGAT  
AATTATATAATTCCATATATGCATGC

**Abbildung 7a:****Eigenschaften von pPS24:**

Gesamtlänge: 6452 bp  
 vector Backbone: pBluescript SK+, ganzes Konstrukt zwischen XhoI und SacI  
 Schnittstellen.

GstA1 Promoter:	694-2891
Transcription start:	2892
GstA1 5' UTR	2892-2988
WIR1 5' UTR (part)	2989-3034
WIR1 part of 5' CDS + Intron	3035-3246
Germin 9f-2.8 Gen	3258-4003
ATG Germin	3277
Stop codon:	3949
CmV 35S Terminator:	4017-4210

## Sequenz:

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTGTTAAAATTCCGGTAAATTTGTTAAATCAGCTCATTTTTAACCAATAGGCCG  
 AAATCCGGCAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTGGAACAAGAGTCCA  
 CTATTAAGAACGTTGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCACATCACC  
 CTAATCAAGTTTTGGGTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGAC  
 GGGGAAAGCCGGCGAACGTTGGCGAGAAAGGAAGGGAAAGCGAAGAGCGGGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG  
 GTCACTGCTGCGCTAACCAACACCCGCCGCGCTTAATGCCGCTACAGGGCGCTCCCATCGCCATTCAAGGCTGCG  
 CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTCGCTATTACGCGAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT  
 TAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAGCTGTTAAACACGAGCTGGCGCTAACGGCGTAATACGACTCACTA  
 TAGGGCGAACCTGGGTACCGGCCCCCCCCCTCGAGCTAGAACACTAGTGGATCCCGACGCCAAGTGGAGCCGACAGCCCC  
 AGGTTCCAAGGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGCGAGGTACTGGATGACGAGCACCTGGCTGGC  
 GGGTGGTGGCGAGTAGAACCCAGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTCTCCCTCACCGCGATCTGCTCCCTGGGTG  
 GGGGTGCGCGGTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGCTGCCGCTGGCGTTCTGCTGCCGGTGGAGTCGCCGACCGGC  
 GTGCTGCTGCTAGGACAATGGTGGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTGGCGAACAGAGATCCGAGTCCTGGGAGAT  
 CAGTGAGGCCAGGTGCTATTGGCCTATCAATTGGCAGGGTCTGGGAACGGCGTGGCGTGAACAGAGGTGCTAGG  
 CTGCTAGCTAGGAAACTGGATCCTGGAACGCTGGAGGGCAAGTCCGGTATGCTAAGTACTTTAACCTTCTTCACA  
 TCCACCTGATTGAGATTATTTGATCTAAATTAACTTGCACAAATATATGTTGATATCCATCTACTATAATTGCTTAC  
 AATCAAATTATATGTTGATTTTTAGTTAGAACAGATTATGCACTAAATCTGAATGTTCTCACATGCATGATT  
 TAGTTAACCTTAAAGAGTTACTAAGTCTGATAAAAGAGATTTGGAGAACACCAAAACCTCGTGAGGTGTT  
 TGCCCTACGGAAAGGTTGCTATGTAATGATTATTAGGATCAAAGTTGAGGATAAAACGTAACCTCTCGATGTA  
 TCTTTATACAACTTGTAGTTAGTATATGGAGAGGTGATTAAACCTTGTGTTAACAGTAGAGATAAGTTATT  
 CCACACTGACCAAAGCAACTATTGGCAATATCTCGTAGCTGGTAGAGGCCAGAGCCGTTGGAAAGTGTCTTGCT  
 ATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTAGGCCATGGAAAAGTGTGTCGCTACCAATGGCCAACGTGCTAGC  
 GATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTATAGAACATGCAAGGCCAGTGGCAAGTGGAAAATGATTGATCGCTGGCA  
 AGCTTAACCTCGGAACCTATAGCATTCAACTGAATCAGAACAAAGATTAAAAAAACATTTCCATCGATAGTGA  
 AATTATTCAATTGAGTGACAACGAAATCATATTGGAATGTACATTACTTGTGATTAAATTAGAGGCAATTTC  
 CCTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATAACCCACCTTAGTGTGTTGAGACAACGAGAGGGCACATTGCTTTGGTGCT  
 ACCATCTCTCAAGCTCAAATAAGTGTGCGGACACGATTATCTTCCCCGTTGGAATATCGTGGCTGGTAGAGCTA  
 GCGAAAAATCTCCATGTTGGAATATGTCGGCAGCGGGATAGCCGCATGCACTGTAAGTCTCTTACCTTACATTG  
 CTCAAGTGACACTGTATGTCGCCCTACCAACTGCTAAATCAATGGGCAACTGCTAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATT  
 TACAGTGTGTTGCTACAGTCTGACTTTGTTCTCATTAACTAGTACTAGTGTGACTACTGTCGTTACCTGCTTCCCT  
 CTCCACGTTAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAGGGCGCATCGATGTTGAGTAATTGAA  
 TTTCAAATCTATCTGGGTATATTGGTCTTCACCGATGTTGGGGGCTGTCGGAATTGGTCCGCGATCTACA  
 AAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTCTCAATCCGTACCAACGCACTGTTCTAACTAGTACTTACTTCCTTCGCA  
 ACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAAACTAACAAAGATGATTACTTACCCGGTTAAATGATTCAAGAGCTATT  
 ATTGGCACTCATCTCATATCTTTGGTAGAAATGAAATAAGCAGATCTAGACACTAGCTAAGAGCT  
 TAGCCTGTTATTCTTGGGCCACGGGGCGGGGTGTTGCTCCCTGCTGTATAATGGAGATCAACATCCAAG  
 GCCTCCTCCCACACACACGCTACAGAGCAGAGCAGACTCTGCTCCAGTATCTGCCCTCTCGCTGCTGAGAGC  
 ATCCATCACGTGAAGTTACGGACAAACTACGTACACAGGGCAGCTAGCTCTGAAACCTCGCTGAAACGCACCTGCAGA  
 TCGCTCTCTCGTCGTCGCCGCGATCATCATCACACAGCTCGCTGCCCTGGAGGCCAGGGCGTCCACGCCG  
 GCCTCAGGTCAGTCGCGGGTGTGCTGTTCTGATTTCTCCCCATTGGTAAATTGATTAACCTGTTATACATGCTGACC  
 TCGACCTGCTGATAACGTCGCCATGGTTCCCGTCCAGGCAACGGGGGGATCCAGCTTATTACATAGCAAGCATGG  
 GGTACTCCAAAACCTAGTAGCTGGCTGTTGCAATGCTGTTACTAGCTCCGGCGTCTTGGCCACCCAGACCC  
 CTCCAGGACTCTGTCGCCGACCTCGACGGCAAGGGCGTCTGGTGAACGGGCACACGTGCAAGGCCATGTCGGAGGC  
 CGGGCAGCAGCTCTCTCGTCAAGTTGGCCAAGGGCGAACACGTCACCCGGGAACGGCTCCGGTGAACGG  
 TCGACGTTGGCCAGTGCCCCGGTACCAACACGCTGGGTGTTGCTGATGAAACCGCGTGGACTTGCTCCGGAGGCACCA  
 CCACCAACATCCACCCGCGTGCCACCGAGATCGGCATCGTGTGAAAGGTGAGCTTCTCGTGGGAATCCTTGGCAGCCT  
 CGACTCCGGGAACAAGCTACTCGAGGGTGGTGCAGCGCCGGAGAGACGTTCTCATCCACGGGGCCTCATGCACTTCC  
 AGTTCAACGTCGGAAGACCGAGGCCTCCATGGTCGCTCCTCAACAGCCAGAACCCGGCATTGCTTGTGCCCCCTC  
 ACGCTCTTCGGCTCCAACCGCCCACCCGAGACGCGGGTGTGCAACAGGCACCTGGGGTGGAGGCCAGGGTGTGGA  
 ACTTCTCAAGTCCAAGTTGCCGCTGGGTTAATTCTAGGAGCCTCCCTGAAATGATAATTATCATATGCA

TGCCCTGCAGGCATGCCCGCTGAAATCACCAAGTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTATAATAATGTGTGAGTAGTTCC  
CAGATAAGGGATTAGGGTTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCCTAGTATGTATTGTATTT  
GTAAAATACTCTATCAATAAAATTCTAATTCTAAAACCAAATCCAGGGTACCGAGCTCGAATTCTAGTCTACGCG  
GCCCGCAGCTCCAGCTTTGTTCCCTTAGTGAGGGTTAATTGCGCCTGGCGTAATCATGGTCAAGCTGGTCTGGT  
GTGAAATTGTTATCCGCTACAATTCCACACAACATACGAGCCGAAGCATAAAAGTGTAAAGCCTGGGTGCCAATGAG  
TGAGCTAATCACAATTGCGTGCCTCACTGCCGCTTCCAGTCGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGA  
ATCGGCCAACCGCGGGGAGAGCGGTTGCGTATTGGCGCTTCCGCTTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGT  
CGTCGGCTGGCGAGCGGTACAGCTCACTCAAAGGCGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGATAACGCAGGAA  
AGAACATGTGAGCAAAGGCCAGAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGTTGCTGGGTTTCCATAGGCTCCGC  
CCCCCTGACGAGCATCACAAAATGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCIAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGC  
TCCCCCTGAAAGCTCCCTCGTGCCTCCCTGTTCCGACCGCTGGCTTACCGGATACCTGTCGCCCTTCTCCCTCGG  
GAAGCGTGGCGTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTCGCTCCAAGCTGGCTGTG  
CACGAACCCCCCGTTAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGTAACTATGTCCTTGAGTCCAACCCCGTAAGACACGACTT  
ATGCCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTGAAGTGGT  
GCCCTAATCAGGCTACACTAGAGGACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGGAAAAGAGTT  
GGTAGCTCTTGATCCGCAACAAACCCCGCTGGTAGCGGTTTTTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCCAGAAA  
AAAAGGATCTCAAGAAGATCTTGTATTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAAAGAAAATCAGTTAAGGGATT  
TGGTCATGAGATTATCAAAAGGATCTCACCTAGATCTTTAAATTAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATA  
TATGAGTAAACTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTACGTCAGGACCTATCTCAGCGATCTGCTTATTCGTTCATC  
CATAGTTGCCCTGACTCCCCCTGTTAGATAACTACGATACGGGAGGGTCTACCATCTGGCCCAGTGCTGCAATGATAC  
CGCGAGACCCACGCTACCCGCTCCAGATTATCAGCAATAAACCAAGGCCAGCCGGAGGGCGAGCGCAGAAGTGGCCT  
GCAACTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAATTGGTGCCTGGAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCCAGTTAAGTTGCG  
CAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGTTCCAAAC  
GATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTCGGTCTCGATCGTTGTCAGAAGT  
AAGTTGGCCGCAGTTACTCATGGTTATGGCAGCACTGCTCATGCCATCCGTAAGATGCTT  
TTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCTGAGAATAGTGTATGCGCGACCGAGTTGCTTGCCTTGGCGTCAA  
TACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGTCTCATTTGGAAAACGTTCTCGGGGGGAAACACTCTCA  
AGGATCTTACCGCTGGTGAAGATCCAGTGTACCCACTCGTCACCCACTGATCTCAGCATCTTTACTTCAC  
CAGCGTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGAAAAAAGGGAATAAGGGCAGACCGAAATGTTGAATAC  
TCATACTCTCCCTTTCAATTATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATT  
TAGAAAAATAACAAATAGGGTTCCGCGCACATTCCCCGAAAAGTGCAC

Fortsetzung Abbildung 7a

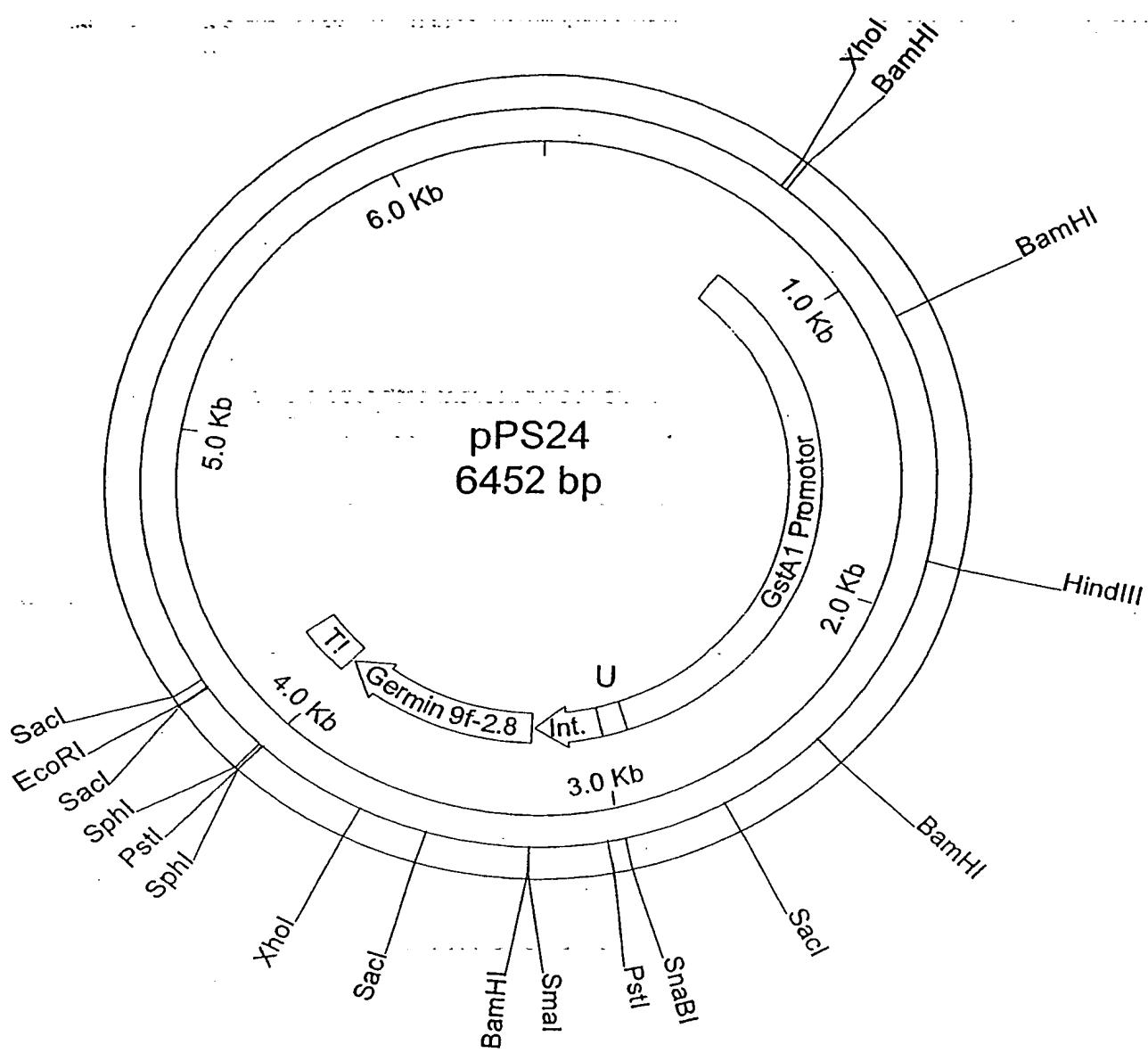


Abbildung 7b

**Abbildung 8:****TaMlo inverted repeats and Mla1 Intron:**

CCACTGTCCACACGAAATGTGCCATCTGAAACCGCCTCTGGAACAGCGTCAGGTGTATGAAGAAGAGGACCCAGTCGGGG  
CGGTGGAACCAGAAGAACCTTGTGCTGGCTCGACCACGGTGCCCCCTTGATGACGCTCGACCGGTCTGGATCTCCAG  
GGCCATCTCCATGATGATCATCTAGCTTGGTCCAACACACAAGAGGATGATGAGAGGGATGAAAGAAACCCAGGTGA  
GTGTGCCGATCCCGTCGATATCAAGGAAGAGGGTGAGGATCGCCACAGCCCACAGCGGGAGGCTGCAGAAAAGAGGCCAAA  
TGTGTCAAGATCATGCAACAAGGACAGCAGGGCAAAGACCATGACGCAGCAAATGATAGTATTGTATCATATGGAAG  
CTAAGCAATATCATATGGAGCCTGACCGACACTCGTGCCTGAATTGATTCAGTTCTAGAGAACAAAAGGTATGCATC  
AATTAGAAAAAGTACACTATTATGTGATGTTGTTCTATGCTAGTGGAACGGATTAGAATTTCATTAAGG  
TCACCTTACTGGCATAAGCAGTTCACACTAAACGGTAAACCTTATAGGTGAAAATTTCAGGCATATATATATATAT  
ATATATATATATGTTGATTCTTCCGGCTTAACAAAATAATTAGCAAGTACTTCTTGCATTGTTCAACGGCTGA  
ATTATTGGCATCGGTCCAAGAAATCCATCTAAATGTTTACATTCACCAAAGTGTGTCTGACAGATGTAACAAAT  
AATAAACCAAAGGAGAGGAAAGGAGATAATGTTACAAAATTAAATCAAACCTTACCTTCTCCT  
TACCTACCCAGTTAAAAACACATATTATTTAAAGAGAGGCAACATGCGCCAAAGGCTACCCCTGAAAATCCTAAA  
ATATTGACATTGACTGATGACCAAACAAAAGTTAAATTGTCTCTCCCTTATCACATTATATTCCATGCATGCCTTT  
TTCTGGAAACTACTATCAGCAAATTTAGATGAAAGGATAATGCCACATAATTTCAGTCTCCAAGAGATTGTTAGTTG  
TCATATATAATTGGTGGGCCAATCTATTCTGGTCTTTTATGATCTACTGACCAATTGAACTTCTGTAGTTAAT  
TGTATTCTATGAATGATCACTCATCAAAACTTGTATTGTTTACTCTGTTGAATCTTGAATATTATTCATTT  
GTTCATCATCAGATTGGAGGCCATAATAGATGCTTAATGAGAGTAAGATTATCGATCTCAAACACATGCTCTTACTA  
GTGTTGAATATATACCCTTTAGATGTTAGTCACCCATAGATTATGACCCCTCAGCTTCTGATGTGTATGTATG  
ACCTTACACTGACACTCTGAACTAATGTAGGTATCTGCTCTGCAGGAATTGGCACAGCAGTGTGTCAGGCTCCATATGA  
TATTGCTTAGCTTCCATATGATAACAATACTATCAGTTGCTGCGTCATGGTCTTGGCCCTGCTGGCCTTGTGATGA  
TCTTGACACATTGGCCTTTTCGCGAGCCTCCCGCTGTGGGCTGTCGATCCTCACCCTTTCATGATATCGACGGG  
ATCGGCACACTCACCTGGGTTTCTTCATCCCTCTCATCATCTCTGTGTTGAAACCAAGCTAGAGATGATCATCAT  
GGAGATGGCCCTGGAGATCCAGGACCCGTCGAGCGTCATCAAGGGGGCACCCGTGGTCGAGGCCAGCAACAAGTTCTTCT  
GGTCCACCGCCCCGACTGGTCTTCTTCATACACCTGACGCTGTTCCAGAACCGCTTCAGATGGCACATTCTGT  
TGGACAGGCATGCGACTGG

**Abbildung 9a:****Eigenschaften von pWIR5-TaMlo-RNAi:**

Gesamtlänge:	7633 bp
vector Backbone:	pBluescript SK+, ganzes Konstrukt zwischen XhoI und SacI
Schnittstellen:	
GstA1 Promoter:	694-2891
Transcription start:	2892
GstA1 5' UTR	2892-2988
WIR1 5' UTR (part)	2989-3034
WIR1 part of 5' CDS + Intron	3035-3246
TaMlo IRL	3252-3556
Intron Mla1	3698-4731
TaMlo IR2	4877-5190
CamV 35S Terminator:	5191-5391

**Sequenz:**

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTGTAAAATTGCGTTAAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTAACCAATAGGCCG  
 AAATCGGCAAAATCCCTATAAAATCAAAGAAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTCAGTTGGAACAAGAGTCCA  
 CTATAAAGAACGTTGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGCTATCAGGGCGATGGCCCCTACAGTGAAACCAC  
 CTAATCAAGTTTTGGGTCGAGGTGCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGAC  
 GGGAAAGCCGGCGAACGTTGGCGAGAAAGGAAGGGAAAGCGAAAGGAGCAGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG  
 GTCACGCTGCGCGTAACCACCAACACCCCGCGCTTAATGCAGCGCTACAGGGCGCTCCATTGCCATTAGGCTGCG  
 CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGGGGCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCAT  
 TAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTCCCAGTCACGACGTTGAAACGACGCCAGTGAGCGCGCTAAATCAGACTCACTA  
 TAGGGCGAATTGGTACCGGGCCCCCTCGAGTCTAGAAACTAGTGGATCCCGACGCCAGTGGAGGCCAGCAGCCCC  
 AGGTCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGCGAGGGTACTGGATGACGAGCAGCACCTGGCTGG  
 GGGTGTGGGAGTAGAACCCAGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCTCACCGCGATCTGCTCCCTCTGGGTG  
 GGGTCGCGGGCTGACGTTCTGTTGGGGGTGGCGCTGGCGTCTGCGGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGC  
 GTGCGCTGCTAGGACAATCGGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCGATCGATTGGCGAAGAGATCGAGTCCTGGGAGAT  
 CAGTGAGGCCAGGTGCTATTGGCCTATAATTGCCAGGTTCTGGGAACGGGGCGTGGCGTATCAACGAGGTGCTAGG  
 CTGCTAGCTAGGGAACTGGATCCTGGAACGTGGAGGGAGCAAGTCCGGTATGCTAAAGTACTTTAACCTCTTCACA  
 TCCACCTGATTCAAGATTGGATCTAAATTAACTGCAAAAAATATATGTGATATCCATCTACTATAATTGCTTAC  
 AATCAAATTATATGTGATTTTTAGTTAGAAGATTATGCACTAACTGATGTTCTCACATGCTGATT  
 TAGTTAACTTAAAGAGTTACTAACTAGTCTGATAAAGAGATCTTGGAGCAACACAAACCTCGTAGGGTGT  
 TGCCCTACGAAAGGGTGTGCTATGTAATGATTATTAGGATCAAAGTTGAGGATAACGTAACCTCTCGATGTA  
 TCTTTATACAACATTGAGTTAGTTAGTATATATGGAGAGAGTGATTTAACACTTGTGTTAAGAGTAGAATAAGTT  
 CCACACTCTAGGAAACGAACTATTGCCAAATATCTCGCTAGCTGGTGGAGAGGCCAGGCGTGGAAAGTCTGCTTGCT  
 ATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTAGGCCATGGAAAAGTGATGTGCTGCCATACCGCAACTGCTAGC  
 GATGTAATAATAGCATCCAAGTGTGTTTATAGAACATGCAAGGCCAGTGGCAAGTGGAAAATGATTGATCGCTGGCA  
 AGCTTAACCTCTCGGAACTTATAGCATCAACTGAATCAGAACAAAGATAAAAAAAAAACATTTCCATGATGTAAGTGA  
 AATTATTCAATTGAGTGACACGAAAATCATATTGAAATGTACATTACTGTTGATTAAATTAGAGGCATTGCT  
 CCTTTTTAGTTAATAAGATATGCAATACCCACCTTAGTGTGTTTGAGACAACGAGAGGGCACATTGCTTTGGTGC  
 ACCATCTCTCTCAAGCTCAAATAAGTGTGCGGACACGATTATCTCCCGCTGGAAATATGTCGGCTGGTAGAGCTA  
 GCGAAAATCTCCATGTTGAATATGTCGGCAGCGGATAGCGCCATGCATGTAAGTCTCTTACCTTG  
 CTCAAGTGACACTGTATGCGCTACCGTAAATCAATGGCCAAGTGCTAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATT  
 TACAGTGTGTTGCTACAGTCTCTGACTTTGTTCTCATTTAGACTAGCTGACTACTGTCGCTTACCTGCTTCCCT  
 CTCCACGTTAGGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAGGGCGCGATCGATGTGGAGTAATTGAA  
 TTGCAAATCTATCTGTTGTTGATATTGTCCTCAGGATTTGGGAGGGCTGCGGAAATGTTCCCGATCTACA  
 AAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTCTCAAATCCGTACCAACGACCGTGTCTCAACTAGTACTACTTCTCGCACC  
 ACAAAATGGAATAGGGAGTATGATAAAACTAACAAAGATGATTACTTACCCGGTTAAATGATTCAAGAGCTCATTA  
 ATTGGCCTACATCATTTCTGTTGAGAAAATGAAACGAGATCTAGACACTAGCTAAAGAGTCGATG  
 TAGCCTGTTATTCTGGGCCACGGGGCGGGTGTGGTCTCTGCTGTGATAAAATGGAGATCAACATCCAAG  
 GCCTCTCCCACACACACAGCTACAGAGCAGACGAGCTGCTCCAGTATCTGCCCTCTCTGCCCTGCTAGAGC  
 ATCCATCACGTGAAGTTCACGGACAAACTACGTACACAGGCAGCTAGCTCTGAAACCTCGCTCGAAACGCACTGCGA  
 TCGCTCTCTCGTCGTCGCCGCGATCATCATCAACAGCTCGCTGCGCTTGGAGCCACGCCGTCACGCCGCC  
 GCCTCAGGTCACTCGTCGGACGGTGTCCGTTCATTCCTCCCATTGTTGTAATTGATTAACTTGTATACATGCTGACC  
 TCGACCTGCTGAATAACGTCGCCATGGTTCCAGGACCCGGCCACTGCTCCACACGAAATGTGCCATCTG  
 AACCGGTTCTGGAACAGCGTCAGGTGATGAAGAAGAGGCCAGTCGGGGCGGTGGAACCGAAGAAACTTGTGCTGG  
 CTCGACCCACGGGTGCCCCCTGATGACGCTCGACCGGTCCTGGATCTCCAGGGCCATCTCCATGATGATCATCTAGCT  
 TGGTCCAACACACAAGAGGATGATGAGAGGGATGAAAGAAAACCCAGGTGAGTGTGCGGATCCCGTGCATATCAAGGAAG  
 AGGGTGAAGGATGCGCAACGGGGAGGTGCGAAAAGAGGCCAAATGTCAGATCATGCAACAAAGGACCGAC  
 AGGGCAAGAACCATGACGCGACAAACTGATGATGTTATGATCATATGGAAGCTAAGCAATATCATATGGAGCCTGACGAC  
 ACTCGTGGCGATTGATTCGTAATTCTAGAGAACAAAGGTATGATCATTAAGTAACTTAAAGTACACTATTATGTGA  
 TGTTGTTCTATGCTAGTGGAACGGATTAGAATTTCATTAAGCTACCTTACTGGCATAGCAGTCACAC

TAAACGGTAAACCTTATAGGTAAAAATTTCAGGCATATATATATATATATATATGTTGATTCTTCCGGC  
 TTAACAAAATAATTAGCAAGTACTCTTGTGCAATTGTCACCGGCTGAATTATGGCATCGTCCAAGAAATCCAT  
 CTAATGTTTACATTCAACAAAGTGTGTGTCATGACAGATGTAACAAATAATAAACCAGGAGAGGAAGGAAAGAG  
 GAAGATAAAATGTTACAAAAATTAAACATTATTCTACCTTCTCCTACCCAGTTAAAACACATATTAT  
 ATTAAAGAGAGGCAACATGCGCAAAGGCTACCCCTGAAAATTCTAAACATTGTCATATTGACTGATGACCAACA  
 AAAAGTTAAATTGTCCTCCTTACACATTATTTCAATGCATGCCTTTCTGAAACTTACTATCAGCAAATT  
 GATGAAAGGATAATGCCACATAATTCACTGTCAGTCTCCAAGAGATTGTTAGTGTCAATTAAATTGGTGGGCCAATCTAT  
 TCCTGGGTCTTTATGTAATCTGTCAGTCTGTCATGTCATATTGATCTTATGTCATGACACTCATCCAAA  
 AACTTGTTATTGTTACTCTGTCATGTCATATTGTCATTCATGTCATGACATGGAGGCCATAATA  
 GATGCTTAATGAGAGTAAGATTATGATCTCAAACACATGCTCTTACTAGTGTGAAATATACCCCTTAGATGTA  
 AGTCAACCCATAGATTCAATGACCCCTAGCTTCTGATGTTGATGTCATGACCTTACACTGACACTCTGAACTAATGTA  
 GGTATCTTGTCTGCAGGAATTGGCACAGTGTGTCAGGCTCCATATGATATTGCTTAGTCTCCATATGATACAATAC  
 TATCAGTTGCTGCGTCATGGCTTGGCCCTGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCACATTGGCCTCTTCGAGC  
 CTCCGCTGTTGGCTGTGGCAGTCCTCACCCCTTCTGATATGACGGGATGGCACACTCACCTGGGTTCTTCAT  
 CCCCTCATCATCCTCTGTTGAGGAGCTAGAGATGATCATCATGGAGATGGCCCTGGAGATCCAGGACCGG  
 CGAGCGTCATCAAGGGGACCCGGTGGCAGGACAGTCATGGTCCACAAAGTCTCTGGTCCACCGCCCCGACTGGGCTCTTC  
 TTCATACACCTGACGCTTCCAGAACCGCTTCAGATGGCACATTTCGTTGAGCAGGCTGCGACTGGGATGCCCC  
 TGAAATCACCAGTCTCTACAAATCTATCTCTATATAAATGTTGAGTGTAGTCTCCAGATAAGGAAATTAGGGT  
 TCTTATAGGGTTGCTCATGTTGAGCATATAAGAACCCCTAGTGTATTTGATTTGAAATTGTTATCCGCTC  
 AAAATTCTAATTCTAAACCAAATCCAGGGTACCCGAGCTGAATTCTAGTCTACGCGGCCGAGCTCCAGCTTT  
 GTTCCCTTAGTGAGGTTAATTGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCTGTTGAAATTGTTATCCGCTC  
 ACAATTCCACACAAACATACGAGCCGAAGCATAAAAGTGTAAAGCCTGGGGTCTAATGAGTGAGCTAAC  
 TACATGAGCTTGGGTTGCGCTACTGCCGTTTCACTGCGGAAACCTGTCGTGCCAGTCATTAATGAA  
 TCGTGGCGCTACTGCCGTTTCACTGCGGAAACCTGTCGTGCCAGTCATTAATGAACTGCCAACGCGCGGGG  
 GAGGCCTTGGCTATTGGCGCTTCCGCTCGTCACTGACTCGCTGCCGCTGGCTCGTCGGCTGCCGAGCG  
 GTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGATAACGCAAGGAAAGAACATGTA  
 GCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGGCTGGCGTTTCCATAGGCTCCGCCCTGACGAGC  
 ATCACAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGGATACCCAGGGCTTCC  
 GTGCCCTCCCTGCCCACCTGCCCTTACCGGATACTCTGCCCTTCTCCCTTGGGAGCGTGGCGCTTCTCA  
 TAGCTCAGCTGTTAGGTATCTCAGTCCGCTGAGGCTCCAGGCTGTCAGACACTTATGCCACTGGCAGC  
 CCGACCGCTGCCCTTACCGGTAACTATCGTCTGAGTCCAAACCCGGAAGACACGACTTATGCCACTGGCAGC  
 ACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGAGGCTGCTACAGAGTCTGAAGTGGTGGCTA  
 ACTACGGCTACAC  
 TAGAAGGACAGTATTGGTATCTGCCCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCCGAAAAGAGTTGGTAGCTCT  
 GATCCGGCA  
 AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGTTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAGGATCT  
 CAAGAAGAT  
 CCTTGATCTTCTACGGGTCTACGCTCAGTGGAACGAAAACCTACGTTAAGGATTGTCATGAGATT  
 CAAA  
 AAGGATCTCACCTAGATCTTTAAATTAAAGTGTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAAACTGGTCTG  
 ACAGTTACCAATGCTTAATCACTGAGGCCACCTATCTCAGCAGTCTGCTATTGTTCTAC  
 CCTGGTAGATAACTACGATAACGGGAGGGCTTACCATCTGCCCTTGGCTGCAATGATACCGCAG  
 GGCTCCAGATTATCAGCAATAACCGCCAGGCCAGGGCGAGCGCAGAAGTGGCTCTGCAACTT  
 TATGCCCTCCA  
 TCCAGTCTATTAAATTGTTGGGGAAAGCTAGAGTAAAGTGTAGTCTGCCAGTTAATAGTT  
 GCGCAACGTTGTCATTGCT  
 ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGGTATGGCTTACCGCTCCCAAGGATCAAGGCGAGTTACATG  
 ATCCCCCATGTTGCAAAAAGCGGTTAGCTCTTGGCTCTCCGATGTTGTCAGAAGTAAGTGGCCGAGTGT  
 TAT  
 CACTCATGGTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTCTGACTGGTAGTAC  
 TCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCACCGAGTTGCTCTGCCGGCTCAATACGGGATA  
 ATACCGCGCC  
 ACATAGCAGAACTTAAAGTGTACATCATTGAAAACGTTCTCGGGGAAACACTCTCAAGGATCT  
 ACCGCTGTTGA  
 GATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTCACCCACTGATCTCAGCAGTCTTACTTCACCAGGTTCTGGGTGAGCA  
 AAAACAGGAAGCAAAATGCCGAAAAAGGAAATAAGGGGAGACACGGAAATGTTGAATACT  
 CATACTCTCCCTTTCA  
 ATATTATTGAAAGCATTATCAGGGTTATTGTCATGAGCGGATAACATATTGAAATGTATT  
 TAGAAAAATAACAAATAG  
 GGGTCCCGCAGCATTTCCCGAAAAGTGCAC

Fortsetzung Abbildung 9a

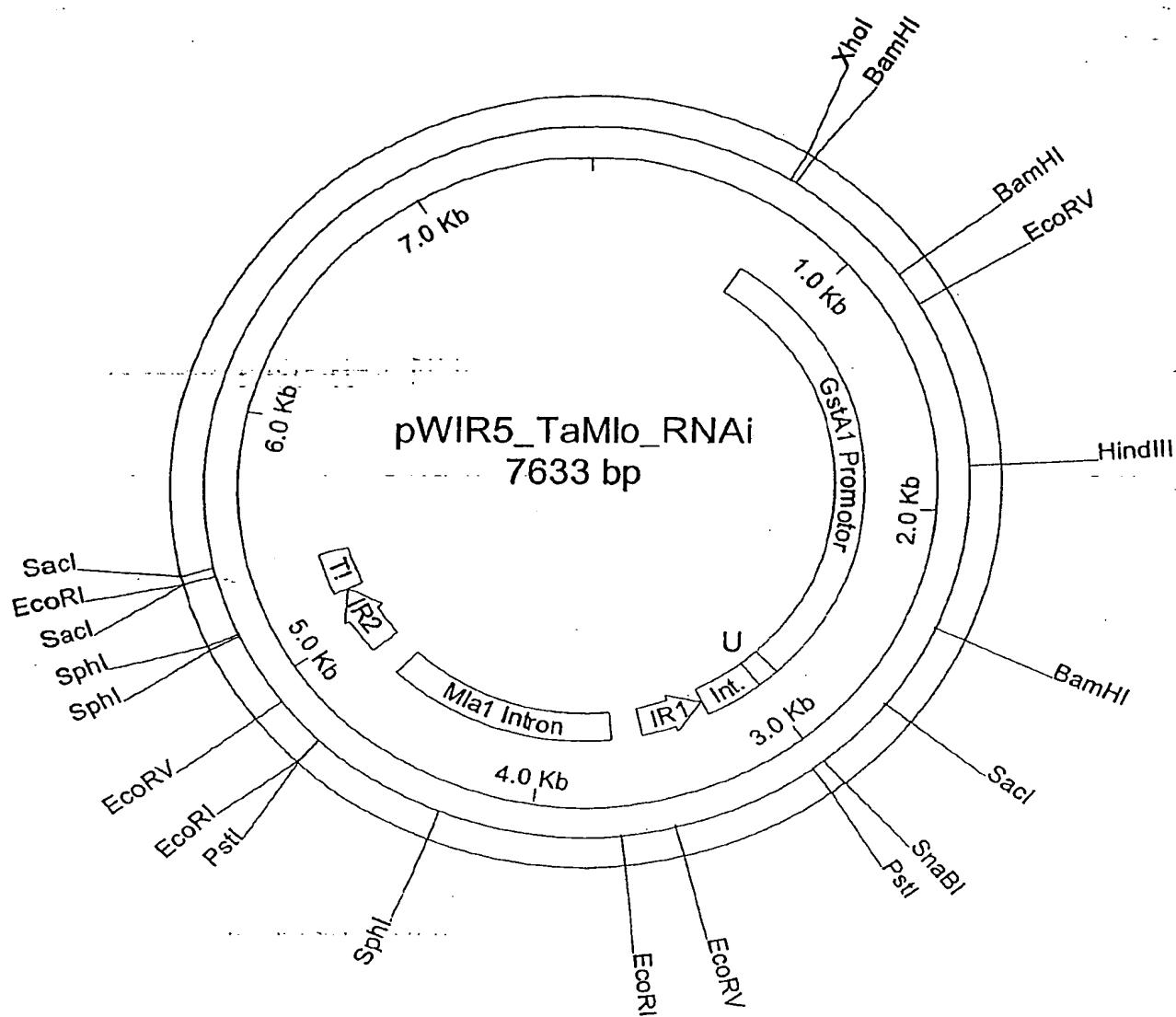
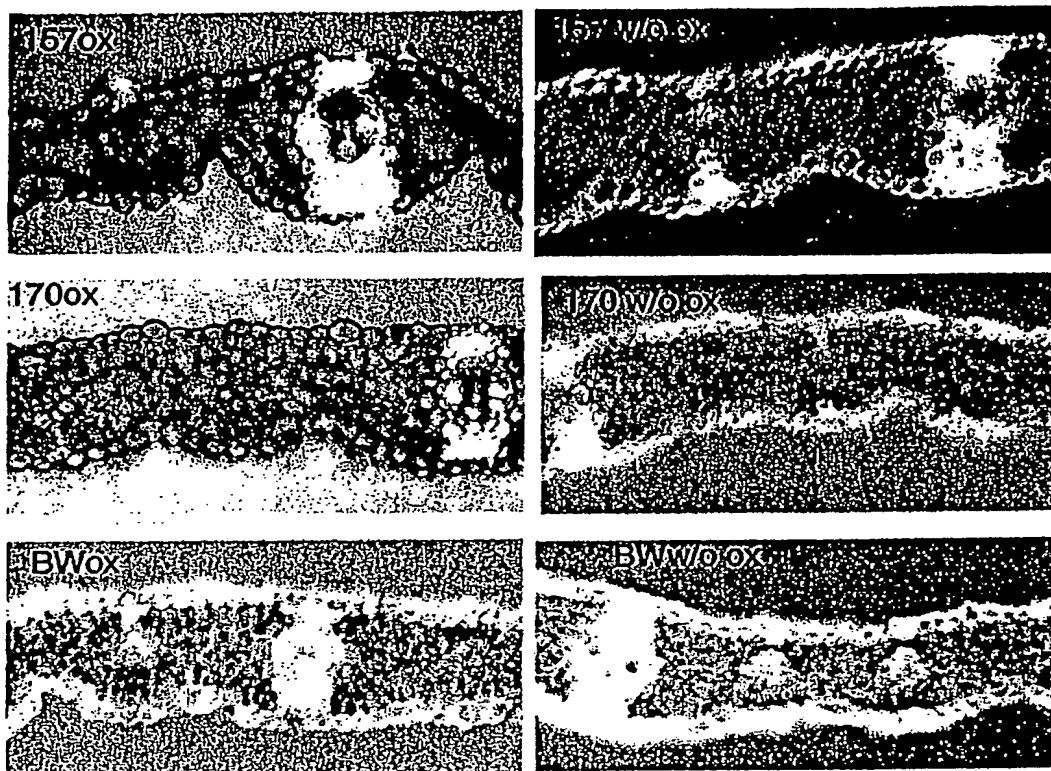


Abbildung 9b

Abbildung 10:

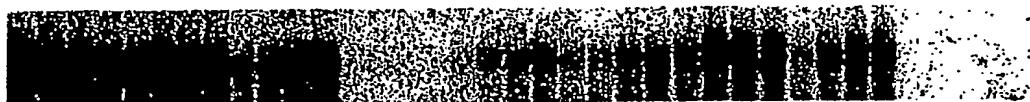


## Abbildung 11:

a)

	2012/3			2013/5			2088/1			2088/2			2106/2			2106/7			2168/4			2168/5			BW		
Leaf #	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3

WIR3



TaGer-4



EtBr



b)

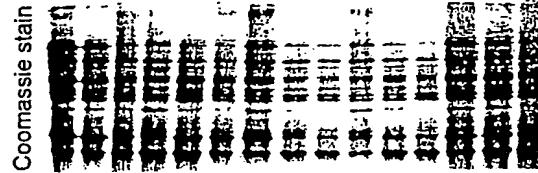
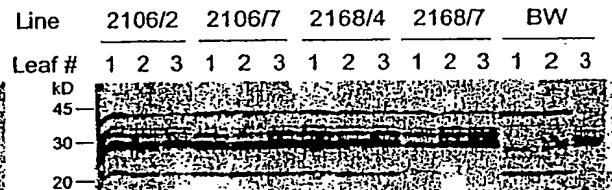
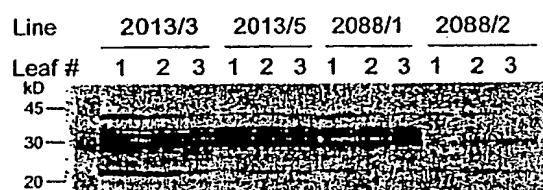


Abbildung 12 A

ppS24

ppS41

#157

BW

#2013

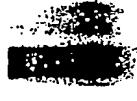
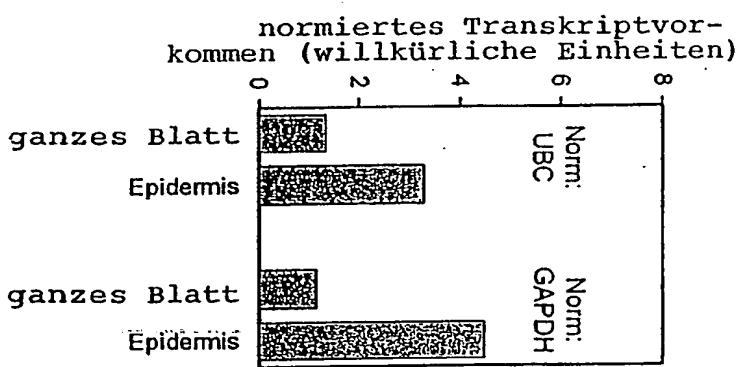
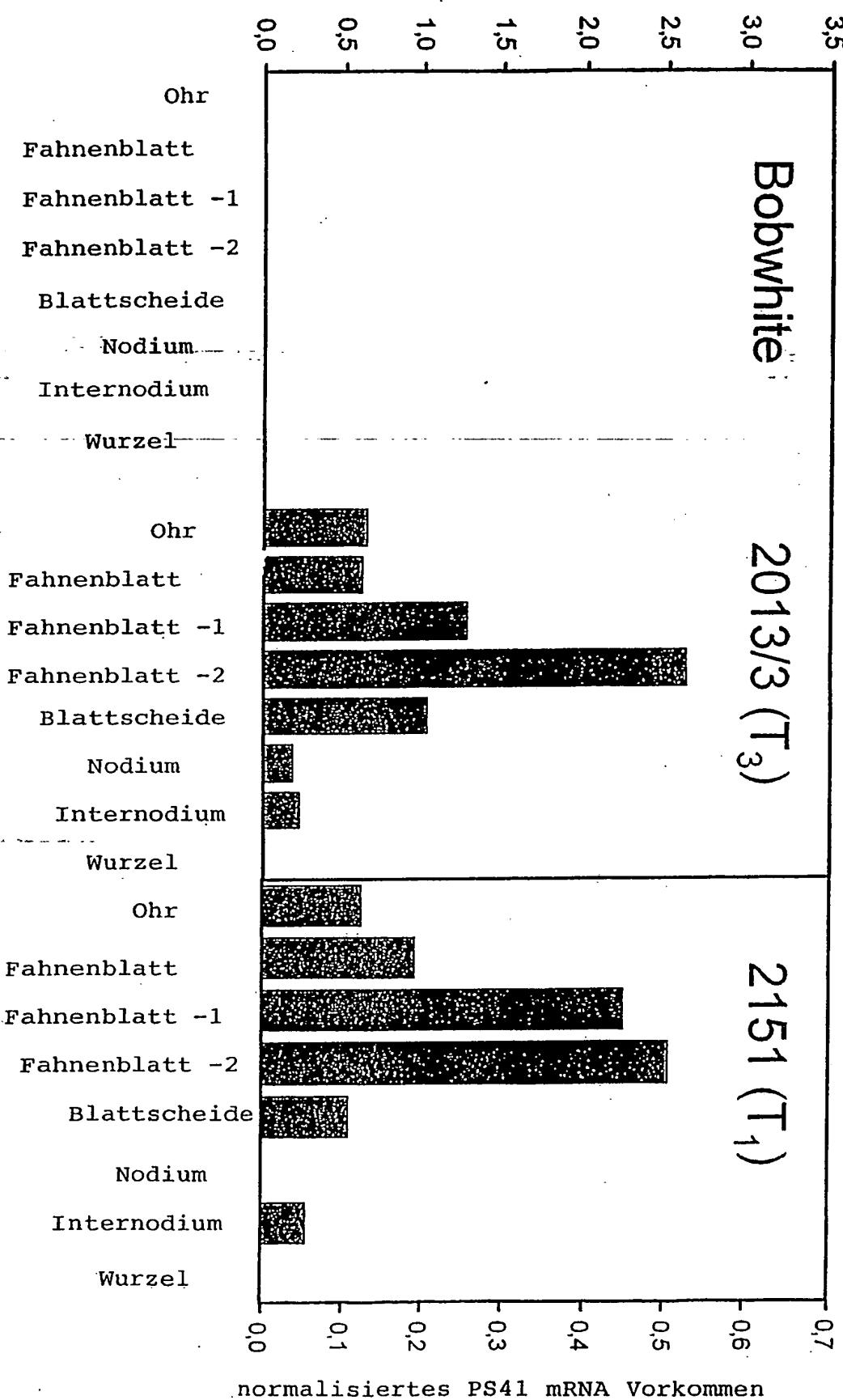
Trans-  
gen

Abbildung 12 B



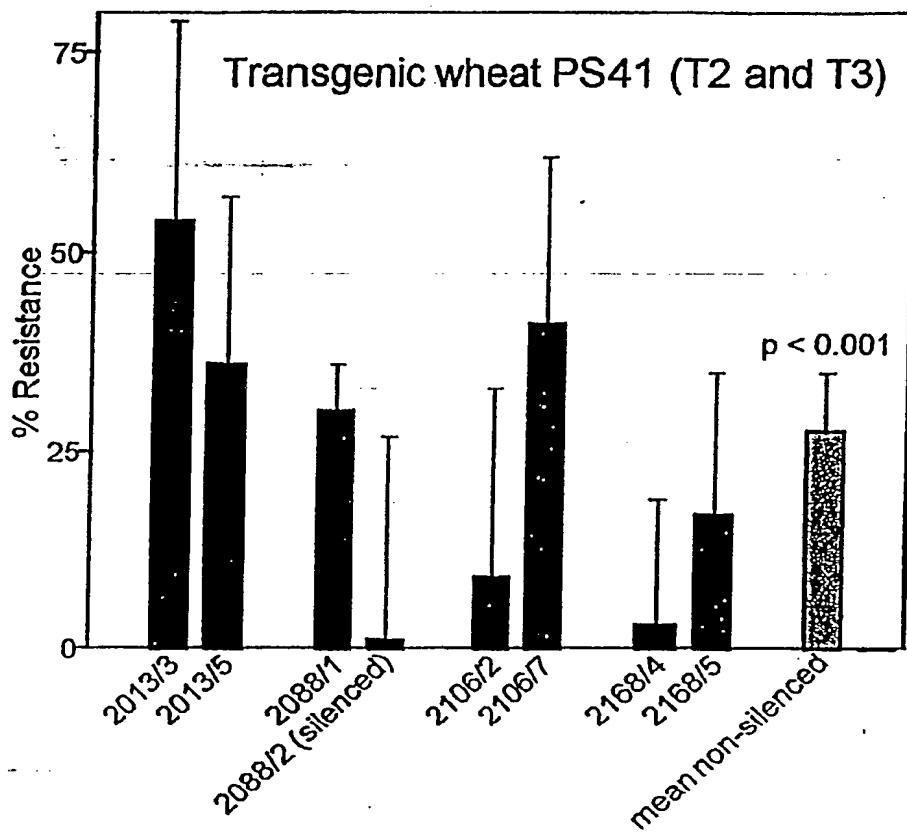
## normalisiertes PS41 mRNA Vorkommen

Abbildung 12 C



**Abbildung 13**

Mehltauresistenz von transgenen Weizenlinien, die das pPS41 Konstrukt tragen.



Das Fahnenblatt adulter Pflanzen wurde abgeschnitten und in einem „detached leaf assay“ mit Weizenmehltau inokuliert, zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen. 7 Tage nach Inokulation wurde der Mehltaubefall bonitiert. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Inokulationsexperimenten mit Pflanzen der T2 und T3 Generation. Sublinie 2088/2 exprimiert kein TAPERO und ist nicht erhöht resistent. Mean non-silenced = Mittelwert aus allen Linien außer 2088/2 und allen Experimenten.

**Abbildung 14**

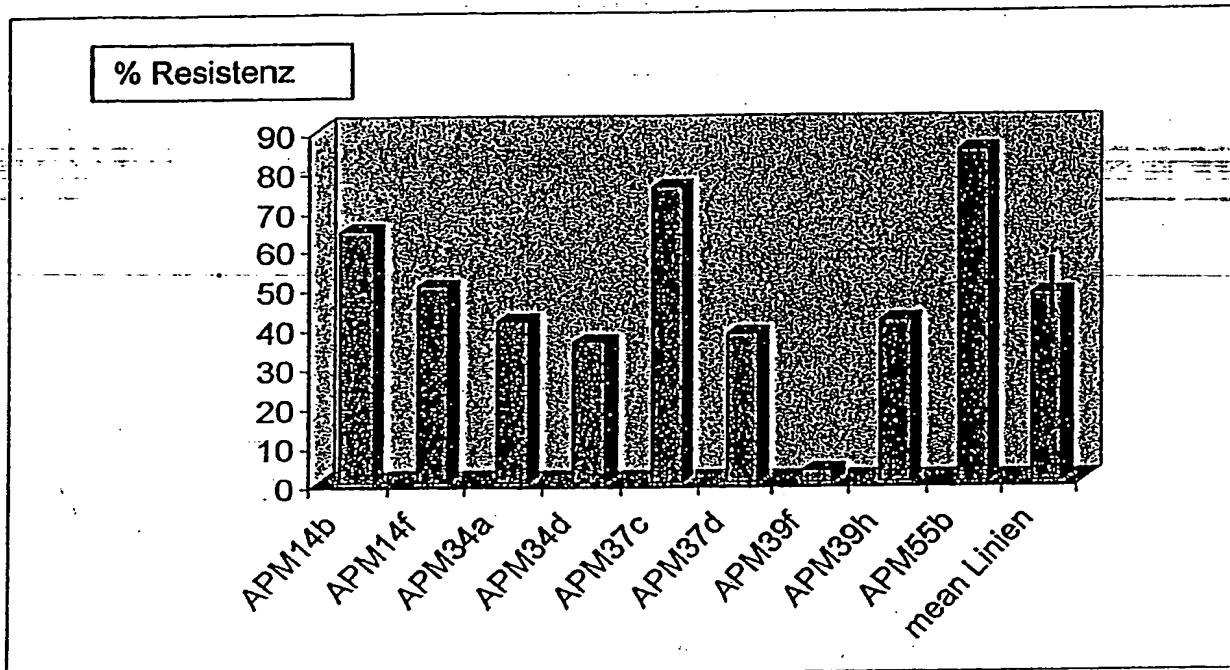
Normaler Wachstumsphänotyp transgener Pflanzen, die das pPS41 Konstrukt tragen.



Pflanzen der T2 Generation wurden zusammen mit Bobwhite Widtypflanzen ausgesät und im Adultpflanzenstadium fotografiert.

**Abbildung 15**

Mehltauresistenz von transgenen Weizenlinien, die das pWIR5-TaMlo-RNAi Konstrukt tragen.



Das Fahnenblatt adulter Pflanzen der T2 Generation wurde abgeschnitten und in einem „detached leaf assay“ mit Weizenmehltau inkokuliert, zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen. 7 Tage nach Inkulation wurde der Mehltaubefall bonitiert. Je 2 Sublinien pro Linie wurden getestet.

1/11

SEQUENZPROTOKOLL

<110> IPK Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanze

## <120> Promotor zur epidermisspezifischen Transgenexpression in Pflanzen

<130> I 7469

<140> DE 103 46 611.8

<141> 2003-10-07

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2198

<212> DNA

<213> *Triticum* sp.

<400> 1

gacgcggcgaag	tggagccgac	agccccccagg	tcccaagccc	tcggcagact	agatcaactag	60
ccctggatcg	gcgagggtgac	tggatgacga	gcagcacctg	gtctggcggg	tgttggcga	120
gtagaaccag	gggcgatggc	gacgcgtga	ccttctccccc	tcaccggcga	tctgctcctt	180
ctgggtgggg	gtcggcggt	gacgttctgt	tgccccgtgg	gggtcgccgg	ctggcggtct	240
gctgcggggt	gggagtgcgc	gaccggcggt	ctgctgttag	gacaatcggt	gaggccagtt	300
aggtgttagc	cgatcgattt	gcgaagagat	ccgagtcctg	gggagatcag	tgaggccagg	360
tgctattttg	cctatcaatt	ggccagggtt	tgggAACGGG	gcgtggcggt	atcaacgagg	420
tgctaggctg	ctagcttaggg	aactggatcc	tggAACGTGG	aggaggcaag	tccggtatgc	480
taagtacttt	aactttccct	cttcacatcc	acctgattca	gattattttg	atctaattaa	540
acttgcaaaa	aatatatgtg	tgatatccat	ctactataat	tgcttacaat	caaattata	600
tgtgattttt	tttagtttag	aagatttata	tgcacagtaa	atctgaatgt	tcttcacatg	660
catgatttag	ttaaacttta	aagagtata	ctaactagtc	ttgataaaga	gatcttttg	720
agcaacacca	aacctcggt	ggtgttttgc	ctacggaaag	gttgtgttat	gtaatgatta	780
ttatttagat	caaagtgtg	ggataaaacgt	aaaaccttct	cgatgtatct	tttatacaac	840
attgttagtt	agttatataat	ggagagagt	atthaacact	tttgtttaa	gagtagaata	900
agttatccca	cactctagcc	aaacgaacta	tttggcaaat	atctcgctag	ctggtgagag	960
ccagagcgt	ggaaagtctg	tcttgcattt	aaggcacaag	catcaaacag	gaacatttag	1020
agccatggaa	aagtgtatgt	tcgcctacca	atggggccaa	tgcttagcgat	gtaataatag	1080
catccaagg	gatTTTTT	agaacatgca	aggcggtggc	aagtggaaa	atgattgtac	1140
gctggcaagc	ttaactctcg	gaactttag	cattcaactg	aatcagaaca	aagattaaaa	1200
aaaaatacat	ttccatcgat	agtggaaaat	tattcaattt	agtgacaacg	aaaatcatat	1260
tggaatgtac	atttacttgt	tgatTTTAA	tttagaggcat	ttttctacct	tttttagtta	1320
ataagatatg	catataccca	cccttagtgt	tttcgagaca	acgagaggc	acattgtctt	1380
tggtgctacc	atctctctca	agcctcaaat	aagtgtgcg	gacacgatta	tcttcccgcg	1440
ttggaaatata	gtggcctgg	agagctagcg	aaaaatctt	catgttggaa	tatgtoggca	1500
gccggatagc	cgcctatgc	gtaaaagtctc	ttttacctt	acacttgctc	aagtgcacact	1560
gtatgtcgcc	taccacttgc	taaatcaatg	ggccaaactgc	tagcgacgt	atagtagcaa	1620
gttgattttac	agtgttttgc	tacagtctc	tgactttgtt	tcttcatttt	agactagctg	1680
actactgtcg	tttacactgccc	ttcccttctc	cacgttagag	gatccagttc	tgatattttag	1740
acctcgacga	tgggaggaag	ggcgcgatcg	atgtggagta	atttgaattt	caaattata	1800
tatctggggt	atattggtcc	ttcacggatg	tttggggggc	tgtcgaaat	tgttcccgcg	1860
atctacaaaa	gtaatggag	ggagtagttt	tttctccaat	ccgtaccaac	gcacgtgtt	1920
ctaactagta	tttacttcc	tcgcaccaca	atatggaaa	gagggagtat	cgataaacta	1980
acaaagatga	ttacttaccc	ggtttaaatg	atttcaagagc	tcatttaatt	tggcactcat	2040
catttcataat	atcttttttgc	gtagaaatga	aataaaagcag	atctagacac	tagctaaaa	2100
gtcgatgtag	ccttggattt	tccttggggc	acgcggggccg	ggtgtgtgc	tccctgctct	2160
gtgtataaat	ggagatcaac	atccaaggcc	tcctccca			2198

<210> 2

<211> 114

2/11

<212> DNA  
<213> Triticum sp.

```
<400> 2
gtcagtgcg  ggacggtg  cgttcatttc  ctccccat  ttgttaattga  ttaacttgg  60
atacatgctg  acctcgacct  gctgaataac  gtccgtccat  gtttcccgt  ccag  114
```

<210> 3  
<211> 2553  
<212> DNA  
<213> *Triticum* sp.

<400> 3  
gacgccgaag tggagccgac agcccccagg tcccaagccc tcggcagact agatcaactag 60  
ccctggatcg gcgagggtgac tggatgacga gcagcacctg gtctggcggg tggtgggcga 120  
gtagaaccag gggcgatggc gacgcgctga ctttctcccc tcacccggcga tctgctcctt 180  
ctgggtgggg gtcgcggct gacgttctgt tgggggtgg gggtcgcgg ctggcgttct 240  
gctgcgggt gggagtgcgc gaccggcggt ctgtgtctag gacaatcggt gaggccagtt 300  
aggtgttagc cgatcgatttgc gacaaagagat ccgagtccctg gggagatcag tgaggccagg 360  
tgctattttgg cctatcaatt ggccagggttgc tgggaacggg gcgtggcgtg atcaacgagg 420  
tgcttaggtcg ctatcgatggg aactggatcc tggaaacgtgg aggaggcaag tcggatatgc 480  
taagtacttt aacttccctt ctccacatcc acctgattca gattattttg atctaaatta 540  
acttgcaaaa aatatatgtg tcatatccat ctaactataat tgcttacaat caaaattata 600  
tgtgattttt ttagtttag aagatttata tgcacagtaa atctgaatgt tcttcacatg 660  
catgatttag ttaacttta aagatgttata ctaactagtc ttgataaaga gatcttttg 720  
agcaacacca aacctcgatgg ggtgtttgc ctacggaaag ggataaacgtt aaaaaccttct 780  
ttttagtagat caaatgtgt aagatgttata gggagagatg atttaacact tttgtttaa 840  
attgtatgtt agttatataat aacgaacta ttggcaaat atctcgatgatggag 900  
agttatttcca cactctagcc aaacgaacta ttggcaaat catcaaacag gaacatttag 960  
ccagagccgt ggaaagtctg tcttgctatt aaggcacaag tcgcctacca atgggcaac 1020  
agccatggaa aagtgtatgt agaacatgc aaggcttgc aagtggaaa atgattgatc 1080  
catccaagtt gatTTTTTAT gaacttataag cattcaactg aatcagaaca aagattaaaa 1140  
gctggcaagc ttaactctcg aaaaatacat ttccatcgat agtggaaaat tattcaattt 1200  
tggaatgtac atttacttgt tgatTTTAAAG ttagaggcat cccttagtgt tttcgagaca 1260  
ataagatatg catataccca tggtgctacc atctctctca ttggaaatatc gtggcctgg 1320  
gcccggatagc cgccatgcat gtaaagtctc tttaccttt taaatcaatg ggcaactgc 1380  
gtatgtcgcc taccacttgc gttgatttac agtgttttgc actactgtcg cttacactggc 1440  
actactgtcg tttacactggc acctcgacga tgggaggaag tatctgggtt atctgggggt 1500  
tatctgggtt atattggtcc atctacaaaaa gtgaatggag cttacacttctc ttcccttctc 1560  
ctaactagta cttacttctc acaaagatga ttacttaccc gtttaaatg attcggatcg 1620  
catttcataat atctttttg gtagaaatga aataaaggcag ttcacccatg tttggggggc 1680  
gtcgatgtat ctttgggtt atctacaaaaa gggatgtt ttttcccaat tccgttccatc 1740  
gtgtataaaat ggagatcaac tcccaaggcc tcccccaca ggtttaaatg attcggatcg 1800  
gcagaggttt gctccagttt gtagaaatgc aataaaggcag tccctgggcc acgcggggcc 1860  
agttcacgga caaactacgt ctttgggtt atctacaaaaa ggtgtgttgc tccctgttct 1920  
ctgcagatcg ctctttctgt gtagaaatgc aataaaggcag cgtcgtcgcc gcatcgatca 1980  
ggagccacgg ccgtccacga cggccggcc tcaggtcagt ttgattact tggttatacat 2040  
tttccctcccc atttttgtaa tccacacatg tccctgttct ggtgtgttgc tccctgttct 2100  
taacgtccgt ccatggtttcc ggttttttttccacacatg tccctgttct ggtgtgttgc tccctgttct 2160  
ccgtccaggg acc gtagagcatc catcacgtga 2220  
gttagagcatc aaacctcgct tcaacagctc cgtctgcctt 2280  
acacaggcag acacaggcag ttagtctcg tcaacagctc cgtctgcctt 2340  
ctgcagatcg ctttgggtt atctacaaaaa gggatgtt ttttcccaat tccgttccatc 2400  
ggagccacgg ccgtccacga cggccggcc tcaggtcagt ttgattact tggttatacat 2460  
tttccctcccc atttttgtaa tccacacatg tccctgttct ggtgtgttgc tccctgttct 2520  
taacgtccgt ccatggtttcc ggttttttttccacacatg tccctgttct ggtgtgttgc tccctgttct 2553

<210> 4  
<211> 1246  
<212> DNA  
<213> *Triticum* sp.

&lt;400&gt; 4

accaccacac cactccacca gtaagaagtg cagcaggtag cttagtaagcc ggcgttagctt 60  
 tgctttgcga gctagcttagc taaccatggc cgcctctgccc tcttcgcctt ctcttggtt 120  
 gtcgtggct ctggccacgg cgccgtcgcc gcagctgtca ccgacacctt acgacacgtc 180  
 ctgccccagg gcccctggca tcatcaagag tggcgtcatg gccggcgtga gcagcgaccc 240  
 tcggatgggc gcgicgtgc tccggctgca cttccacgac tgcgtgtcc aaggctgcga 300  
 cgcgtctgtt ttgctgtctg gcatgaaaca aaatgttatac cccaacccgg ggtcgctgag 360  
 gggcttcggc gtcatcgaca gcatcaagac gcagatcgag gcacatctgca atcagaccgt 420  
 ctccctgcgcc gacatcctca ccgtcgccgc cctgtactcc ttgttagccc tcggaggccc 480  
 gtcatggaca gtcccctctgg ggagaagaga ttccacagat gcaaacgggg cggcggcaaa 540  
 cagcgacctg ccaggctta catctagccg gtcagatctt gagctggcat tcagaaacaa 600  
 gggcttcctt acgatcgaca ttgtggccct ctcggcgcg cacaccatcg gccaggccga 660  
 gtgtgggacc tttaaggaca ggatctacaa tgagactaac atcgacacgg ctttcggcac 720  
 atctctccgg gccaactgcc ccaggtcaaa cggcgacggg agcctggcga acctggacac 780  
 gacgacggcc aacacgttcg ataaacgccta ctacaccaac ctcatgtc&gt; agaaggggct 840  
 cctgcactcg gaccagggtc ttgtcaacaa cgacaccacc gacaacactg tccggactt 900  
 tgctcgaaac ccagcggcgt tcagcagcgc ttccacgacc gcaatgtca agatggccaa 960  
 catcgcccg aagacaggca cgccaggccc gatcagctc agctgctcca gggtaactc 1020  
 gtgattgata gacgaggtaa tgcatactag ccagcaccac acgtacgtga atgaataagg 1080  
 ccacagaaacc agtggccaat ataaatacca gctttgaaa ccgtgtattt tatgtacgag 1140  
 tagcagcaaa tcatgcatgc atctacacat atatatgtaa cgatcgaatt cccactttct 1200  
 catgcaaagg catggagaat tactatcaat cttagttata cgtgtta 1246

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 7011

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Triticum sp.

&lt;400&gt; 5

ctaaattgtta agcgttaata tttgttaaaa attcgctta aatttttgtt aaatcagctc 60  
 attttttaac caataggccg aaatcgccaa aatcccttat aaatcaaaaag aatagaccga 120  
 gataagggttg agtgttggc cagtttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 180  
 caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 240  
 ctaatcaagt tttttgggtt cgaggtgccc taaagacta aatcggaaacc ctaaaggagg 300  
 ccccgattt agagcttgac gggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaaagaa 360  
 agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtacgc gtacacgtgc gctgtaccac 420  
 cacaccgcgc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgctgcc cattcgccat tcaggctgca 480  
 caactgttgg gaagggcgt cggtcgccg ctttcgcta ttacgcccagc tggcgaaagg 540  
 gggatgtgtc gcaaggcgt taagttgggt aacgcggg tttcccagt cacgacgtt 600  
 taaaacgacg gccagtgtac ggcgtataa cgactcacta tagggcgaat tgggtaccgg 660  
 gccccccctc gagtctagaa ctatgtggat cccgacgccc aagtggagcc gacagcccc 720  
 aggtcccaag ccctcgccg actagatcac tagcccttgg tcggcgaggt gactggatga 780  
 cgagcagcac ctggcttgc ggggtttggg cgagtagaac caggggcgt ggcgacgcgc 840  
 tgaccttctc ccctcacccg cgatctgtc ttctctgggt ggggtcgccg gctgacgttc 900  
 tggcgccggg tgggggtcgc cggtggcgt tctgtctgcgg ggtgggagtc ggggaccggc 960  
 gtgtctgc taggacaatc ggtgaggccaa gtttaggtgt agcgcgtca ttggcgaaaga 1020  
 gatcccgagtc ctggggagat cagtgaggcc aggtgttatt tggcttatca attggccagg 1080  
 ttcttggaaac ggggcgtggc gtgtacacg aggtgtctagg ctgtctgtca gggaaacttgg 1140  
 tccttggaaac tggaggaggc aagtccgtt tgcataagttt ttaactttt ctttttccaca 1200  
 tccacctgtat tcagattttt ttgtatctaa ttaacttgc aaaaatataat gtgtgatatac 1260  
 catctactat aattgttttac aatcaaaaatt atatgttatt ttttttagtt tagaaagattt 1320  
 atatgcacag taaaatctgaa ttttttttccac atgcattttttagttt tagaaagattt 1380  
 atactaacta gtcttgatata agagatcttt tggagcaaca cccaaaccccg tgagggtttt 1440  
 tgcctacggaa aagggtgtgc tatgtatgtt ttatttttagt gatcaaaatgtt gtaggataaa 1500  
 cgtaaaacct tctcgatgtt tcttttatac aacatttttag ttttagttata tatggagaga 1560  
 gtgatttaac actttgtttaa taagagttaga ataagttttt ccacactctca gccaaacggaa 1620  
 ctatttggca aatatctcgc tagctgtgtt gggccagacg cgtggaaatgtt ctgtcttgct 1680  
 attaaggcac aagcatcaaa caggaacatt tagagccatg gaaaagtgtat gtgtcgccca 1740  
 ccaatggcc aactgttgc gatgtatata tagcatccaa gttgattttt tatagaacat 1800  
 gcaaggcgtt ggcaagtgccc aaaatgttgc atcgctggca agcttaactc tcggaaactt 1860  
 tagcattcaat ctgaatcaga acaaaagatta aaaaaaaaaata catttccatc gatagtggaa 1920

aattattcaa	tttagtgcaca	acgaaaatca	tattggaaatg	tacatttact	tgttgattt	1980
aaatttagagg	cattttctta	ccttttttag	ttaataagat	atgcataatac	ccacccttag	2040
tgttttcgag	acaacgagag	ggcacattgc	tttgggtgc	accatctctc	tcaagcctca	2100
aataaggtgt	ggggacacga	ttatottccc	gcgttggaaat	atcggtgcct	ggttagagcta	2160
gcgaaaaatc	ttccatgttg	gaatatgtcg	gcagccggat	agcccccatt	catgtaaagt	2220
ctcttttacc	tttacacttg	ctcaagtgc	actgtatgtc	gcctaccact	tgctaaatca	2280
atgggccaac	tgctagcgac	gtaatagtag	caagttgatt	tacagtgttt	tgctacagg	2340
ctctgacttt	gttcttcat	tttagactag	ctgactactg	tcgcttacct	gccttccctt	2400
ctccacgtta	gaggatccag	ttctgatatt	gagacctcg	cgatgggagg	aagggcgcga	2460
tcgatgtgga	gttaattgaa	tttcaaattct	atctatctgg	ggtatattgg	tccttcaccg	2520
atgtttgggg	ggtgtcgga	aattgggtcc	gcatctaca	aaagtgaatg	gagggagtag	2580
ttgtttctcc	aatccgtacc	aacgcacgtg	tttctaacta	gtacttactt	ccttcgcacc	2640
acaatatgga	atagaggggag	tatcgataaa	ctaacaaga	tgattactt	cccggtttaa	2700
atgattcaag	agtcattta	atttggcact	catcatttca	tatatcttt	ttggtagaaa	2760
tgaaaataaag	cagatctaga	cactagctaa	aaagtgcatt	tagccttgtt	atttccttgg	2820
gccacgcggg	ccgggtgtgg	tgctccctgc	tctgtgtata	-aatggagat-	-aacatccaag-	2880
gcctccccc	acacacacac	gctacagagc	agagcagat	cttgctccag	tatctgcct	2940
ctccctgcctg	cctgttagago	atccatcag	tgaagttcac	ggacaaacta	cgtacacagg	3000
cagctagctc	tcgaaacactc	gctcgaaacg	cacctgcaga	tcgctctt	cgtcgtcg	3060
gccgcgatca	tcatcaacag	ctccgtctgc	cttggagcca	cgccgtcca	cgacgcccgg	3120
gcctcaggc	agtgtcgga	cggtgtccgt	tcatttcctc	cccattttg	taatttgatta	3180
acttgttata	catgtcgacc	tcgacctgt	gaataacgtc	cgtccatgg	ttcccggtca	3240
ggcaccccg	ggtgcaggaa	ttcaccacca	caccactcca	ccagtaagaa	gtgcagcagg	3300
tagctgat	gccccgttag	cttgcgttt	geagctagat	agctaaccat	ggccgcctct	3360
gcctcttgc	tttcttctgt	ggtgcgtgt	getgtggca	cgccgcgt	ggcgcagctg	3420
tcaccgac	tctacgacac	gtcctgcccc	agggccctgg	ccatcatcaa	gagtggcgt	3480
atggccccc	tgagcagcga	ccctcggtat	ggcgcgtcg	tgctccgg	gcacttccac	3540
gactgctcg	tccaaggctg	cgacgcgtct	gttttgctgt	ctggcatgg	acaaaatgt	3600
atccccaa	cggggtcgct	gaggggttcc	ggcgtcatcg	acagcatcaa	gacgcagatc	3660
gagggcatct	gcaatcagac	cgtctctgc	gccgacatcc	tcaccgtc	cgccccgtgac	3720
tccgtttag	ccctcgagg	gccgtcatgg	acagtcctc	tggggagaag	agattccaca	3780
gatgcaaa	aggccgcggc	aaacagcgac	ctgcccagg	ttacatctag	ccggtcagat	3840
ctttagctgg	cattcagaaa	caagggctc	ttacagatcg	acatggtggc	cctctcg	3900
gcfgcacacca	tcggccaggc	gcagtgtgg	acctttaagg	acaggatcta	aatgagact	3960
aacatcgaca	cggccttcgc	cacatcttc	cgggccaact	gccccagg	aaacggcgcac	4020
gggagcttgg	cgaaccttgg	cacgacgac	gccaacacgt	tcgataacgc	ctactacacc	4080
aacctcatgt	cacagaaggg	gctcctgcac	teggaccagg	tgctgttcaa	caacgacacc	4140
accgacaa	ctgtccggaa	cttgcgtcg	aaccacg	cgttcagcag	cccttcac	4200
accgcat	tcaagatggg	caacatcg	ccgaagacag	gcacgcagg	gcaagatcagg	4260
ctcagctgt	ccagggtgaa	ctcgtgattt	atagacgat	tactgcatac	tagccagcac	4320
gacacgtac	tgaatgaata	aggccacaga	accagtggcc	aatataaata	ccagcttctg	4380
aaaccgtgt	tttatgtac	gagtagcagc	aatcatgoa	tgcatactaca	catatatatg	4440
taacgatcga	atccccactt	tctcatgca	aggcatggag	aattactatc	aatcttagt	4500
atacggtat	aaaaagccgc	cgcgaattcg	atataaagat	tatcgatacc	gtcgaccc	4560
acctgcaggc	atggccgtcg	aaatcaccag	totctctca	caaatactatc	tctctctata	4620
ataatgtgt	agtagttccc	agataaagg	attagggtt	ttatagggtt	tcgtctcatgt	4680
gtttagcata	taagaaaccc	tttagtgcata	tttgcatttt	taaaataactt	ctatcaataa	4740
aatttctaa	tcctaaaacc	aaaatccagg	ggtaccg	tgcatttca	gtctacgcgg	4800
cccgagatc	cagctttgt	tccctttagt	gagggttaat	tgccgtt	gctaatcat	4860
ggtcata	gtttctgt	tgaaatgtt	atccgtc	aattccacac	acatatacg	4920
ccggaaagcat	aaagtgtaaa	gcctgggtg	cctaatgat	gagctactc	acattaattt	4980
cggtcgctc	actgcccgt	ttccagtcg	gaaacctgtc	gtgcccagct	cattaatgaa	5040
tcggccaa	cgcggggaga	ggcggttgc	gtattggc	cttccgc	tcctcg	5100
ctgactcg	gcgcgtggc	gttcggctgc	ggcgagcgg	atcagtcac	tcaaaggc	5160
taatacggtt	atccacagaa	tcagggata	acgcaggaa	gaacatgtg	gcaaaaggcc	5220
agcaaaaaggc	caggaaccgt	aaaaagccgc	cgttgcgt	gttttccat	aggctccgg	5280
cccctgacga	gcatcacaaa	aatcgacgt	caagtca	gtggc	aaacccgg	5340
tataaaagata	ccaggcg	ccccctggaa	gctccctcg	gegctct	cttccgaccc	5400
tgccgc	ttac	tcggctt	tccttcggg	aagcgtgg	cttctcata	5460
gctcac	ctgt	atgttgcgt	aggtcg	ctccaagct	ggctgtgt	5520
acgaacccc	cgttcagccc	gaccgtcg	ccttacccgg	taactatgt	tttgagtc	5580
acccggtaag	acacgactt	tcgcaactt	cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	5640
cgaggtatgt	aggcggtgt	acaggttct	tgaagtgg	gcctaactac	ggctacacta	5700

5/11

gaaggacagt atttggtatac tgcgctctgc tgaagccagt tacccctcgga aaaagagttg 5760  
 gtagcttgc atccggaaa caaaccacccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaga 5820  
 agcagattac ggcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc ttgtatctt tctacggggt 5880  
 ctgacgctca gtggAACGAA aactcacgtt aaggattttt ggtcatgaga ttatcaaaaa 5940  
 ggatcttac ctagatctt ttaaattaaa aatgaagttt taatcaatc taaagtatat 6000  
 atgatcaa ac ttggctcgac agtaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga 6060  
 tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactcccgt cgtagata actacgatac 6120  
 gggaggcgtt accatctggc cccagtgcgt caatgatacc gggagaccca cgctcaccgg 6180  
 ctccagattt atcagcaata aaccagccag cgggaaggc cgagcgcaga agtggcctg 6240  
 caacttatac cgcctccatc cagtcttata attgttgcgt ggaagctaga gtaagtagtt 6300  
 cgccagttaa tagtttgcgt aacgttgcgtt ccattgtcac aggcatcggt gtgtcacgt 6360  
 cgtcgtttgg tatggctca tttagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgt 6420  
 ccccatgtt gtgcaaaaaa ggggttagct cttcggtcc tccgatcggtt gtcagaagta 6480  
 agttggccgc agtgttatca ctcatggta tggcagcaact gcataattctt cttactgtca 6540  
 tgccatccgt aagatgttt tctgtgactg gtgagtaact aaccaagtca ttctgagaat 6600  
 agtgtatgcg ggcaccgagt tgcttgcct cggcgtaat acgggatataat accgegccac 6660  
 atagcagaac tttaaaagtgt ctcatcattt gaaaacgttc ttccggggcga aaactctcaa 6720  
 ggatcttacc gctgttgcg tccagttcga tctaaccac tcgtgcaccc aactgatctt 6780  
 cagcatctt tactttcacc agcggttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccc 6840  
 caaaaaaggg aataaggcgc acacggaaat gttgaataact catacttttc cttttcaat 6900  
 attattgaag catttatcag gtttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt 6960  
 agaaaaataa acaaataaggg gttccgcgcga catttccccg aaaaagtgcac 7011

<210> 6  
 <211> 746  
 <212> DNA  
 <213> Triticum sp.

<400> 6  
 agcttattac atagcaagca tgggtactc caaaacccta gtagctggcc tggcgcaat 60  
 gctgttacta gtcggccgc tcttggccac cgaccacagc cctctccagg acttctgtgt 120  
 cgccgaccc gacggcaagg cggctcggt gaacgggcac acgtgcaga ccatgtcgga 180  
 ggcggcgcac gacttctct tctcgtaaa gttggcaag gccggcaaca cgtccacccc 240  
 gaacggctcc gccgtgacgg agtgcacgt ggcggatgg cccggtacca acacgctggg 300  
 tgggtccatg aaccgcgtgg actttgtcc cggaggcacc aacccaccac acatccaccc 360  
 gctgtccacc gagatcgca tcgtgtatgaa aggtgagctt ctcgtggaa tccttggcag 420  
 cctcgactcc gggacaacgc tctactcgag ggtggcgcgc gccggagaga cgttcctcat 480  
 cccacggggc ctcatgcact tccagttcaa cgtcgtaag accgaggcct ccatggtcgt 540  
 ctccctcaac agccagaacc cccgcattgt ctctcgccccc ctcacgctct tcggctccaa 600  
 cccggccatc ccaacccggg tgctcaccaa ggcactccgg gtggaggcca gggtcgtgga 660  
 acttctcaag tccaaggttt ccgctgggtt ttaatttcta ggagccttcc ctgaaatgtat 720  
 aattatataa ttccatatat gcatgc 746

<210> 7  
 <211> 6452  
 <212> DNA  
 <213> Triticum sp.

<400> 7  
 ctaaaattgtt aagcgtaataa ttttggtaaa attcgctta aatttttgtt aaatcagctc 60  
 atttttaac caataggccg aaatcgccaa aatcccttat aatcaaaaag aatagaccga 120  
 gatagggttg agtgggttgc cagtttggaa caaggtcca ctattaaaga acgtggactc 180  
 caacgtcaaa gggcgaaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 240  
 ctaatcaagt tttttgggtt cgaggtgcgg taaagcacta aatcggaacc ctaaaggggag 300  
 ccccccgtt agagcttgc gggaaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaaagg aaggaaagaa 360  
 agcgaaagga gccccggccta gggcgctggc aagtgtacgt gtcacgctgc gctaaaccac 420  
 cacacccggcc gggcgatcccgcc cggcgatggc cttcgccat tcaggctgc 480  
 caactgttgg gaaaggccat cggcgccggc ctctcgctta ttaacggccac tggcgaaagg 540  
 gggatgtgtt gcaaggccat taagttgggtt aacgcccaggg tttcccaagt cacgacgtt 600  
 taaaacgacg gccagtgagc ggcgtataa cgactcaacta tagggcgaat tgggtaccgg 660  
 gccccccctc gaggcttagaa ctagtggatc cccgacccgg aagtggagcc gacagcccc 720



7/11

aggccgtttg cgtattggc gctttccgc ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt 4560  
 cggtcggtcg cggcgagcgg tatacgctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 4620  
 atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agaaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 4680  
 taaaaggcc gogttgtcg tgcgttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacaa 4740  
 aaatcgacgc tcaagtacaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcg 4800  
 tccccctgga agctccctcg tgccgtctcc tggccgacc ctgcccgtta cggatcacct 4860  
 gtccgcctt ctcccttcgg gaagegtggc gctttctcat agtcacgct gtaggtatct 4920  
 cagttcggtg taggtcggtc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc cggttcagcc 4980  
 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgatcc aacccggtaa gacacgactt 5040  
 atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattacgaga gcgaggatg taggcgggtgc 5100  
 tacagagttc ttgaagttt ggctctaacta cggctacact agaaggacag tatttggat 5160  
 ctgcgtctg ctgaaggccag ttacccctcg aaaaagagtt ggtagctt gatccggcaa 5220  
 acaaaccacc gctggtagcg gtggttttt tggcaag cagcagatta cgcgcagaaa 5280  
 aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacggg tctgacgctc agtggAACGA 5340  
 aaactcacgt taagggattt tggcatgag attatcaaaa aggtctca cctagatcct 5400  
 tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata tattgagtaaa cttggctctga 5460  
 cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc 5520  
 catagttgcc tgactccccg tcgtgttagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 5580  
 ccccaagtgc gcaatgatac cggcagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 5640  
 aaaccagcca gccggaaggg cccggcgcag aagtggctt gcaactttat cccctccat 5700  
 ccagtttatt aattgttgcc gggagctag agtaagtagt tcgcccgtta atagttgcg 5760  
 caacgttgtt gccattgcta caggcatcg ggtgtcacgc tcgtcggtt gtagggcttc 5820  
 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tggcaaaaa 5880  
 agcggtttgc tccttcggc ctccgatcg tgcagaagt aagtggccg cagtttatac 5940  
 actcatgggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgcacatccg taagatgctt 6000  
 ttctgtact ggtgagttact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 6060  
 ttgtctttgc cccgcgtcaa tacggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 6120  
 gtcatcatt gaaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggtcttac cgcgttgag 6180  
 atccagttcg atgttaaccca ctctgtcacc caactgatct tcagcatctt ttacttcac 6240  
 cagcggttct gggtgagcaa aaacaggaag gcaaatgcc gaaaaaagg gaataaggc 6300  
 gacacggaaa tggtaatac tcatactctt ctttttcaa tattattgaa gcatttatca 6360  
 gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaatagg 6420  
 gttccgcgc acattttcccc gaaaagtgcc ac 6452

<210> 8  
 <211> 1939  
 <212> DNA  
 <213> Triticum sp.

<400> 8

ccactgtcca	cacgaaatgt	gccatctgaa	acgcgttctg	gaacagcgtc	agggttatga	60
agaagaggac	ccagtcgggg	cggtggaaacc	agaagaactt	gttgcgggc	tcgaccacgg	120
gtgccccctt	gatgacgctc	gaccggctt	ggatctccag	ggccatctcc	atgatgatca	180
tctctagctt	ggttccaaca	cacaagagga	tgtatggagg	gatgaaagaa	acccagggtg	240
gtgtgccat	cccggtcgata	tcaaggaaga	gggtgaggat	cgccacagcc	cacagcgga	300
ggctgcgaaa	agaggccaaa	tgtgtcaaga	tcatgcaaca	aggaccagca	ggggcaaaa	360
ccatgacgca	gcaaaactgt	agtattgtat	cataatggaa	ctaagcaata	tcataatggag	420
cctgacgaca	ctcggtccga	attcgattcg	tgaatttcta	gagaacaaa	ggtatgcac	480
aatttagaaa	aaagtacact	attatgtat	gtttgttcc	tatgtatgt	gaacggatta	540
gaattttttt	ttcatttaagg	tcacccattac	tggcataaggc	agttcacact	aaacggtaaa	600
ccttataagg	gaaaattttc	aggcatatat	atataatata	atataatata	atgtttgatt	660
cttccggct	taacaaaata	attagcaagt	acttctgtt	gcattttgtt	caacggctga	720
attatttggc	atcgggtccaa	gaaatccatc	taaattttt	acatttcacc	aaagtgtgt	780
tcatgacaga	tgtaccaat	aataaaccaa	aaggagagga	aggaaagagg	aagataaatg	840
ttacaaaaat	ttaaatccaa	cttatttcta	cctttctct	tacccatccaa	gtttaaaaac	900
acatattata	ttttaaagag	aggcaacatg	cgcacaaaggc	tacccttggaa	aattccataaa	960
atattgtaca	tttgactgt	gaccaaacaac	aaagttaat	tgttcttcc	ttatcacatt	1020
atatttccat	gcatgcctt	tttggaaac	ttactatcg	caaaatttag	atgaaaggat	1080
aatgccacat	aatttcagtc	tccaaagagat	ttgttagtt	tcatatatta	aattgggtgg	1140
ccaatctatt	cctgggtctt	tttatgtatc	tacttgacca	tttgaacttc	tgttagtaat	1200
tgtattctat	gaatgatcac	tcatccaaaa	actgttatt	tgtgtttac	tctgttgaat	1260
cttgaatatt	tattcatttt	gttcatcata	cgattggagg	cccataatag	atgcttaatg	1320

agagtaagat tatcgatctc caaacacatg cttcttacta gtgttgaata tataccctt 1380  
 tagatgtata gttcaaccca tagattcata tgaccctcg ctttctgtatg tgtatgtatg 1440  
 accttacact gacactctga actaatgtag gtatctgtc ctgcaggaat tcggcacgag 1500  
 tgtcgcatgg ctccatatga tattgcttag ctccatatg atacaataact atcagittgc 1560  
 tgcgtcatgg tcttgcccc tgcgtgttgc tgcgtgtatga tcttgcacaca ttggcctct 1620  
 ttgcgcagcc tcccgtgtg ggctgtggcg atcctcaccc tcttccttga tatcgacggg 1680  
 atcggcacac tcacccgttgc ttcttcatc cctctcatca tcctcttgc tgcgtgttgc 1740  
 aagcttagaga tgcgtatcat ggcgcgcctgaggatgcc aggaccggc gagcgtatc 1800  
 aaggggggcac ccgtgtcgaa gcccagcaac aagtcttgc gttccaccg ccccgactgg 1860  
 gtcctcttct tcatacacact gacgtgttc cagaacgcgt ttcagatggc acatttcgtg 1920  
 tgacaggca tgcgtactgg 1939

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 7633

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Triticum sp.

&lt;400&gt; 9

ctaaattgtatcgttata ttttgttaaa attcgcttata aatttttgcgtt aaatcagctc 60  
 atttttttaac caataggccg aatcggcaa aatcccttat aatcaaaaag aatagaccga 120  
 gatagggttg agtgttgcgtt cagtttggaa caagagtccatcattaaaga acgtggactc 180  
 caacgtcaaa gggcaaaaaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 240  
 ctaatcaagt tttttgggtt cgaggtgcgc taaagcacta aatcggaaacc ctaaaggag 300  
 ccccccgttattt agagctgtac gggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaaagg aaggaaagaa 360  
 agcgaaaaagga gccccggccta gggcgctggc aagtgttagcg gtcacgctgc gctgtaccac 420  
 cacacccggcc ggcgttatacg cggcgcttaca gggcgctgtcc catttcgcattt tcaggctgc 480  
 caactgttgg gaaaggcgat cggtgcgggc ctcttcgtata ttacggccagg tggcgaaagg 540  
 gggatgtgttgc gcaaggcgat taagttgggtt aacgcggagggtt ttttccaggat caccgttgc 600  
 taaaacgacg gccagtgagc ggcgtataaacta cgactcaacta tagggcgaat tgggtaccgg 660  
 gccccccctc gagtctagaa ctgtgttgcgtt cccgacgcgg aagtggagcc gacagcccc 720  
 aggtcccaag ccctcgccg actagatcac tagcccttgcg tggcgaggt gactggatga 780  
 cgagcagcac ctggcttgcg ggtgttgggg cggatagaac cggggggcgat ggcgacgcgc 840  
 tgaccttctc ccctcacccgg cgtatctgtccttgcgtt ggggtcgccg gctgacgttgc 900  
 tgggtcgccggg tgggggtcgcc ggcgtggcgt tctgtgtccg ggtggggagtc gccgaccggc 960  
 gtgtgtgtgc taggacaatc ggtgaggccaa gtttaggtgtt agccgatcgatc ttggcgaaga 1020  
 gatccgagtc ctggggagat cagtggggcc aggtgttattt tggcctatca attggccagg 1080  
 ttctgggaac gggcgccggc gtgatcaacg aggtgtttagg ctgtgtacta gggaaactgga 1140  
 tcctggaaacg tggaggaggc aagtccgtatc tgctaaatc ttaactttt cttcttcaca 1200  
 tccacctgtatc tcaagattttt ttgtatctaaa ttaacttgc aaaaatataat gtgtgatatac 1260  
 catctactat aattgttttac aatcaaaaattt atatgttattt ttttttagtt tagaagattt 1320  
 atatgcacag taaatctgaa ttttcttacatc atgcgttattt tagtttacta taaaagatgtt 1380  
 atactaacta gtcttgcataa agagatctttt tggagcaaca cccaaacctcg tgaggtgttt 1440  
 tgcttgcggaa aaggtgtgc tatgtatgtt ttatttttagt gatcaaagttt gttaggataaa 1500  
 cgtaaaacctt tctcgatgtatc ttttttatac aacattgttag ttttagttata tatggagaga 1560  
 gtgatgttac acgttgcgtt taagagtata ataagtttccacactctca gccaaacggaa 1620  
 ctatggca aatatctcgatcgttgc gggccagacg cgtggaaagt ctgtcttgc 1680  
 attaaggcaca aagcatcaaa caggaacattt tagggccatg gaaaagtgtatc gtgtcgccata 1740  
 ccaatggggcc aactgttagc gatgtatataa tagcatccaa gttgattttt tatagaacat 1800  
 gcaaggcggtt ggcggatgggg aaaaatgttgcg atcgctggca agcttaactc tcggactta 1860  
 tagcattcaatc tgcgtatcaca acaaagatataa aaaaaataa cattttccatc gatgtgaaa 1920  
 aattatttcaatc ttgtgtgaca agaaaatca tattggatc tacattttact tggtgtt 1980  
 aaatttagagg catttttcttca ctttttttagt ttaataagat atgcataatc ccacccttag 2040  
 tgggttcgtatc acaacggag ggcacattgc ttttgggtgtt accatctctc tcaaggctca 2100  
 aataagttgtt gggggacacgat ttttcttccg gctgttggaaat atcggtggccgtt ggttagagct 2160  
 gcaaaaaatc ttccatgttgc gatgtatgtc gcaagccggat agccggccatg catgtaaatgtt 2220  
 ctcttttacc ttttacatgcg tcaagtgcg actgtatgtc gccttaccatc tgctaaatca 2280  
 atggggccaaatc tgctgtcgac gtaatagtagt caagttgtt tacagtgttt tgctacatgtt 2340  
 ctctgtactttt gtttcttcatc ttttagacttag ctgactactg tcgttaccatc gccttccctt 2400  
 ctccacgttac gaggatccag ttctgtatattt gagacctcgatc cgtggggagg aaggggcgca 2460  
 tcgtgtgttgc gtaatttgcgaa ttctaaatctt atctatcttgc ggttatatttgc ttcttcaccg 2520  
 atgtttgggg ggcgtgtcgaa aattgggttcc gcgatctaca aaagtgtatc gaggggaggtag 2580  
 ttgttcttcc aatccgttacc aacgcacgttgc tttcttacta ctgttccacc 2640



ggtggttttt ttgtttcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat 6480  
 ccttgcata tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaaggatt 6540  
 ttggtcata gattatcaa aaggatctt acctagatcc tttaaattha aaaatgaagt 6600  
 tttaaatcaa tctaaatgtt atatgatcaa acttggctg acagttacca atgcttaatc 6660  
 agtgaggcac ctatctcage gatctgtcta tttcgatcat ccatacgatc ctgactcccc 6720  
 gtcgtgtaga taactacgt acgggaggc ttaccatctg gccccactgc tgcaatgata 6780  
 ccgcgagacc cacgctcacc ggtccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccgaaagg 6840  
 gccgagcga gaagtgtcc tgcacttta tccgcetcca tccagtttat taattttgc 6900  
 cgggaaagcta gagtaatgtt ttcgcccattt aatagttgc gcaacgttgc tgccattgtc 6960  
 acaggcatcg tgggtcactg ctcgtcgatc ggtatggctt cattcagtc cgggtcccaa 7020  
 cgatcaaggc gagttacatg atccccatg ttgtcaaaaa aagcgggttag ctcccttcgt 7080  
 cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatgtt tatggcagca 7140  
 ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgtt tttctgtgac tggtgagttac 7200  
 tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctctt cccggcgtca 7260  
 atacgggata ataccgcgc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt 7320  
 tttcggggc gaaaactctc aaggatctt ccgctgtga gatccagttc gatgttaacc 7380  
 actctgtgcac ccaactgtatc tttagcatct tttactttca ccagcgatcc tgggtgagca 7440  
 aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttaata 7500  
 ctctatactct tccttttca attattattga agcattttatc agggttattt tctcatgagc 7560  
 ggatacatat ttgaatgtat tttagaaaaat aaacaaatag gggccgcg cacatttccc 7620  
 cgaaaagtgc cac 7633

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Adaptor-Primer

&lt;400&gt; 10

atatatctgc agggagccac gcccgtccac

30

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Adaptor-Primer

&lt;400&gt; 11

tatccgggc ccgtgcctgg acgggaa

27

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Adaptor-Primer

&lt;400&gt; 12

atatatctcg agtctagaac tagtggatcc

30

&lt;210&gt; 13

<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Adaptor-Primer

<400> 13  
atatattacg tagttgtcc gtgaacttca

30

<210> 14  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid

<400> 14  
gtacacaggc agcttagctct cgaaacctcg ctgcggaaacgc a

41

<210> 15  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid

<400> 15  
catgtgtccg tcgatcgaga gctttggagc gagctttgcg t

41

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/011214

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12N15/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MAUCH F. ET AL: "differential induction of distinct glutathione-S-transferase of wheat by xenobiotics and pathogen attack" PLANT PHYSIOL, vol. 102, 1993, pages 1193-1201, XP002313139	1-26
A	XU F. ET AL: "tandemly duplicated safener induced glutathione s-transferase genes from triticum tauschii contribute to genome and organe-specific expression in hexaploid wheat" PLANT PHYSIOL, vol. 130, 2002, pages 362-373, XP002313140	1-26

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 January 2005

Date of mailing of the International search report

01/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo'nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Keller, Y

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**